

**Die Expression von BMP-2 und BMP-7 im
Gewebsverband des Morbus Dupuytren**

***Molekularbiologische und immunhistologische
Untersuchungen am Nativgewebe***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Henrik Fahner,

geboren am 13. Oktober 1982 in Apolda / Thür.

Eisenberg / Thüringen (2008)

Gutachter

1. Prof. Dr. R. A. Venbrocks, Eisenberg
2. PD Dr. U. Irlenbusch, Arnstadt
3. Prof. Dr. W. Lungershausen, Gera

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. Dezember 2008

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a.d.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
α -SMA	alpha smooth-muscle actin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic proteins
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
H&E	Hämatoxylin-Eosin
I	Involutionsstadium
M.	Morbus
mRNA	messenger-RNA
OP	Operation
P	Proliferationsstadium
PA	Palmaraponeurose
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	platelet derived growth factor
R	Residualstadium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SQ	starting quantity
TBS	Tris buffered saline (Tris - gepufferte physiologische Kochsalzlösung)
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

verwendete Einheiten

Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunden
l	Liter
m	Meter
min	Minuten
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunden

Präfixe

k	Kilo
c	zenti
m	milli
μ	mikro
n	nano

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. Morbus Dupuytren	3
2.1.1. Historie	3
2.1.2. Epidemiologie	4
2.1.3. Anatomie	5
2.1.4. Klinik	6
2.1.5. Therapie	9
2.1.6. Histologie	10
2.1.7. Molekularbiologie	13
2.2. Bone morphogenetic proteins (BMPs)	14
3. ZIELE DER ARBEIT	17
4. MATERIALIEN	18
4.1. Laborgeräte und Instrumente	18
4.2. Chemikalien	19
4.3. Puffer	19
4.4. Antikörper	20
4.5. Test Kits	20
4.6. Verbrauchsmaterialien	20
4.7. Computer Software	21
5. METHODIK	22

5.1.	Gewinnung von Gewebeproben	22
5.2.	Aufarbeitung des Gewebes	23
5.3.	Histologische Stadieneinteilung.....	24
5.3.1.	Herstellung von Gewebeschnitten	24
5.3.2.	H&E Übersichtsfärbung	24
5.3.3.	Auswertung	24
5.4.	Polymerase-Kettenreaktion	25
5.4.1.	RNA Extraktion	25
5.4.2.	Reverse-Transkriptase Reaktion	25
5.4.3.	Real Time PCR.....	26
5.4.4.	Auswertung	27
5.5.	Immunhistologie	28
5.5.1.	Herstellung von Gewebeschnitten	29
5.5.2.	Vorbehandlung	29
5.5.3.	Doppelmarkierung (BMP und α -SMA)	29
5.5.4.	Kontrollen	30
5.5.5.	Auswertung	31
5.6.	Zellkultur	31
5.6.1.	Vorbehandlung	31
5.6.2.	Kultivierung.....	32
5.6.3.	Auswertung	32
6.	ERGEBNISSE.....	33
6.1.	Stadieneinteilung	33
6.2.	Polymerase-Kettenreaktion	34
6.3.	Immunhistologie	38
6.4.	Zellkultur	42
6.4.1.	Zelltypenbestimmung	42
6.4.2.	Polymerase-Kettenreaktion	44

7. DISKUSSION.....	46
7.1. Histologische Stadieneinteilung.....	46
7.2. Polymerase-Kettenreaktion	48
7.3. Immunhistologie	50
7.4. Zellkultur	52
8. SCHLUSSFOLGERUNG	54
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	56
10. ANHANG.....	62
10.1. Antrag an die Ethik-Kommission	62
10.2. Patienten-Einverständniserklärung	65
10.3. Ehrenwörtliche Erklärung	66
10.4. Lebenslauf	67
10.5. Danksagung.....	68

1. Zusammenfassung

Der Morbus Dupuytren ist eine benigne, fibroproliferative Erkrankung der Palmaraponeurose, die zu Fingerkontrakturen führen kann. Sie verläuft histologisch in 3 Stadien, Proliferations-, Involutions- und Residualstadium, die eine gute Korrelation zur Erkrankungsaktivität haben. Obschon bereits verschiedenste Wachstumsfaktoren wie bFGF, TGF- β , EGF und PDGF untersucht und in Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht wurden, ist seine eigentliche Pathogenese nach wie vor unklar.

BMPs sind Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und bilden mit mehr als 30 bekannten Vertretern die größte Untergruppe der TGF- β -Superfamilie.

Für BMP-2 und BMP-7 ist bereits eine Beteiligung an fibrotischen Veränderungen von Lunge, Leber und Niere beschrieben und eine Beteiligung am Morbus Dupuytren in vivo lag daher nahe. Außerdem sind bereits antifibrogene Wirkung in Niere und Leber beschrieben und könnten auch für den Morbus Dupuytren eine Therapieoption darstellen. Eine Arbeit von Shin und Mitarbeitern (Shin et al. 2004) untersuchte bereits BMP-1 bis BMP-11 in Dupuytrenzelllinien. Diese konnten kein BMP-2 und BMP-7 nachweisen. Dass es sich hierbei lediglich um ein in vitro Modell handelte, gab uns Anlass zu dieser Arbeit.

Ob BMP-2 und BMP-7 im Morbus Dupuytren in vivo exprimiert werden, sollte - stadienabhängig - mit totaler mRNA-Extraktion mit reverser Transkription und anschließender PCR von Operationspräparaten von 12 Patienten mit Morbus Dupuytren geklärt werden. Diese wurden mit normalem Gewebe von 4 Patienten verglichen, die aus anderen Gründen operiert wurden.

Die histologische Lokalisation wurde mit Immun-Fluoreszenz-Markierung durch BMP-2 und BMP-7 Antikörper untersucht und durch Doppelmarkierung mit α -SMA verfeinert. Myofibroblasten - eine Art aktivierte Fibroblasten - kommen stadienabhängig in unterschiedlicher Dichte im erkrankten Gewebe vor und zeichnen sich u.a. durch die Expression von α -SMA aus.

Eine anschließende Kultivierung der Zellen sollte mögliche Unterschiede von in vitro zu in vivo untersuchen und eine Anknüpfung an die bereits bestehende Arbeit von Shin et al. leisten.

Eine BMP-2 und BMP-7 Expression konnten wir im Morbus Dupuytren nachweisen, wobei beide eine geringere Expressionshöhe im Residualstadium aufwiesen. Gesunde Proben wiesen gleiche BMP-7 Expressionshöhe wie die Dupuytren Proben auf. BMP-2 konnte hingegen in gesundem Gewebe nicht nachgewiesen werden. In der Immunhistologie zeigte sich eine Ko-Lokalisation mit Myofibroblasten. Außerdem färbten sich Gefäße einheitlich positiv an. Dies ist mit früheren Studien an anderen Wachstumsfaktoren vereinbar.

Zellen in Kultur zeigten keine BMP-2 Expression und eine - offensichtlich - vom Zelltyp abhängige BMP-7 Expression und offenbarten damit einen Unterschied im Expressionsverhalten in vitro im Vergleich zum Nativgewebe.

Mit der vorliegenden Arbeit ist erstmalig die Expression von BMP-2 und BMP-7 im Morbus Dupuytren in vivo untersucht worden. Die Ergebnisse zeigen eine mögliche Beteiligung von BMP-2 am Entstehungsprozess der Erkrankung. Die verminderte Expression von BMP-7 im Residualstadium ist so ähnlich auch an geschädigtem Nierengewebe nachgewiesen und eine BMP-7 Verabreichung konnte im Tierversuch bereits eine Fibrosierung und damit einen Funktionsverlust verhindern. Inwieweit diese BMPs als Alternative in der konservativen Behandlung des Morbus Dupuytren dienen können, muss in weiteren Studien untersucht werden. Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen Zellen in Kultur und in vivo machen deutlich, dass In-vitro-Versuche im Zusammenhang mit dem Morbus Dupuytren nicht ohne weiteres auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind.

2. Einleitung

2.1. Morbus Dupuytren

Der Morbus Dupuytren (M. Dupuytren) stellt einen Symptomenkomplex dar, der mit typischer Beugekontraktur der Finger - besonders IV und V - infolge bindegewebiger Verhärtung und Schrumpfung der Palmaraponeurose einhergeht und zur Ausbildung derber Stränge und Knoten führt (Pschyrembel 2002).

2.1.1. Historie

Die erstmalige Erwähnung dieser Erkrankung wird heute Felix Plater - einem Mediziner aus Basel/Schweiz - zugeschrieben. Er führte die Kontraktur des Ringfingers und des kleinen Fingers in seiner Schrift „Observationum in hominis affectibus“ aus dem Jahre 1614 irrtümlich auf eine Verkürzung der Beugesehne zurück (Plater 1614). Isländische Sagen aus dem 13. Jahrhundert beschreiben einen ähnlichen Zustand und machen es daher wahrscheinlich, dass die Erkrankung bereits Jahrhunderte zuvor bekannt war (Elliot 1999). Im Jahr 1777 identifizierte Henry Cline Sr. durch Untersuchung an Leichen die Palmaraponeurose (PA) als Ursprung der Erkrankung und empfahl 1787 die chirurgische Fasziotomie als Therapie (Cline 1777, Cline 1787).

Baron Guillaume Dupuytren - damals Professor für Chirurgie am Hôtel-Dieu in Paris - (Abb.1) führte 1831 seine erste Fasziotomie durch und präsentierte kurz darauf seine Erkenntnisse in einer Vorlesung, die wörtlich von seinen Assistenten niedergeschrieben wurde (Dupuytren 1831). Sie enthält im Wesentlichen die bereits von Cline gemachten Erkenntnisse, aber deutlich detaillierter. Dupuytren sah als Ursache wiederkehrende Lokaltraumata und verwies später noch auf eine mögliche genetische Komponente bei der Entstehung der Erkrankung, die heute seinen Namen trägt. Erst die Entwicklung von Anästhesieverfahren und Antisepsis machten eine präzisere Chirurgie wie die Fasziektomie möglich, die heute noch die Therapie der Wahl des M. Dupuytren darstellt (Elliot 1999).



Abb. 1 Baron Guillaume Dupuytren (1777-1835), aus (Elliot 1999)

2.1.2. Epidemiologie

Die Prävalenz der Erkrankung variiert von 2% bis 42% und zeigt eine starke geographische Abhängigkeit. So ist in Nordeuropa (v.a. Skandinavien, Großbritannien und Irland), in Australien und Nordamerika ein häufiges Vorkommen zu beobachten. Weniger häufig ist die Erkrankung in Südeuropa und Südamerika und ist selten in Afrika und China. Der M. Dupuytren kann in jedem Alter auftreten, weist jedoch eine steigende Inzidenz im höheren Alter auf. Männer erkranken mit größerer Wahrscheinlichkeit an M. Dupuytren als Frauen (Verhältnis 9:1), wobei die Erkrankungsfrequenz bei Frauen im Alter stärker steigt und sich bei 90 Jahren an die der Männer angleicht. Es ist eine Assoziation von M. Dupuytren zu verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Epilepsien und HIV-Infektionen beschrieben worden. Auch regelmäßiger Alkohol- und Zigarettenkonsum sowie Hypercholesterinämie erhöhen das Risiko an M. Dupuytren zu erkranken (Ross 1999, Rayan 2007). Außerdem besteht ein starker Hinweis auf eine genetische Komponente in der Pathogenese. So zeigen Verwandte bereits an M. Dupuytren erkrankten Patienten eine eindeutig erhöhte Inzidenz der Erkrankung. Es scheint einem autosomal-dominantem Erbgang mit variabler Penetranz zu folgen (Burge 1999).

2.1.3. Anatomie

Die Faszie der beugeseitigen Hand und Finger - von Rayan (Rayan 2007) als Palmarfaszien-Komplex bezeichnet - besteht aus mehreren anatomischen Komponenten: Palmarfaszie, Palmo-digitale Faszie und Fingerfaszie (Abb. 2). Jede dieser Strukturen kann jeweils wieder unterteilt werden. Die Palmarfaszie besteht aus der radialen, der ulnaren und der zentralen Aponeurose, wobei letztere auch als Palmaraponeurose im engeren Sinn bezeichnet wird und den „Kern der Erkrankungsaktivität“ des M. Dupuytren darstellt (Rayan 2007). Sie besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk aus longitudinalen, transversalen und vertikalen Fasern und schützt darunter liegende Strukturen (Ritter 1973). Longitudinale Fasern teilen sich fächerförmig in 4 Bänder (Fasciculi longitudinales), jeweils eines für jeden Finger. Transversale Fasern bilden im Wesentlichen das Schwimmband (Lig. natatorium) und die Fasciculi transversi der Palmaraponeurose (Skoog 1948). Durch vertikale Fasern, die das subkutane Fettgewebe durchsetzen (sog. Grapow-Fasern, (Grapow 1887)), wird eine Verbindung zur Haut (Dermis) der Hohlhand hergestellt und verankern diese somit an der Palmaraponeurose. Dies stabilisiert die Haut in dem Bereich gegenüber Schub- und Scherkräften, was wiederum einen sicheren Griff ermöglicht.

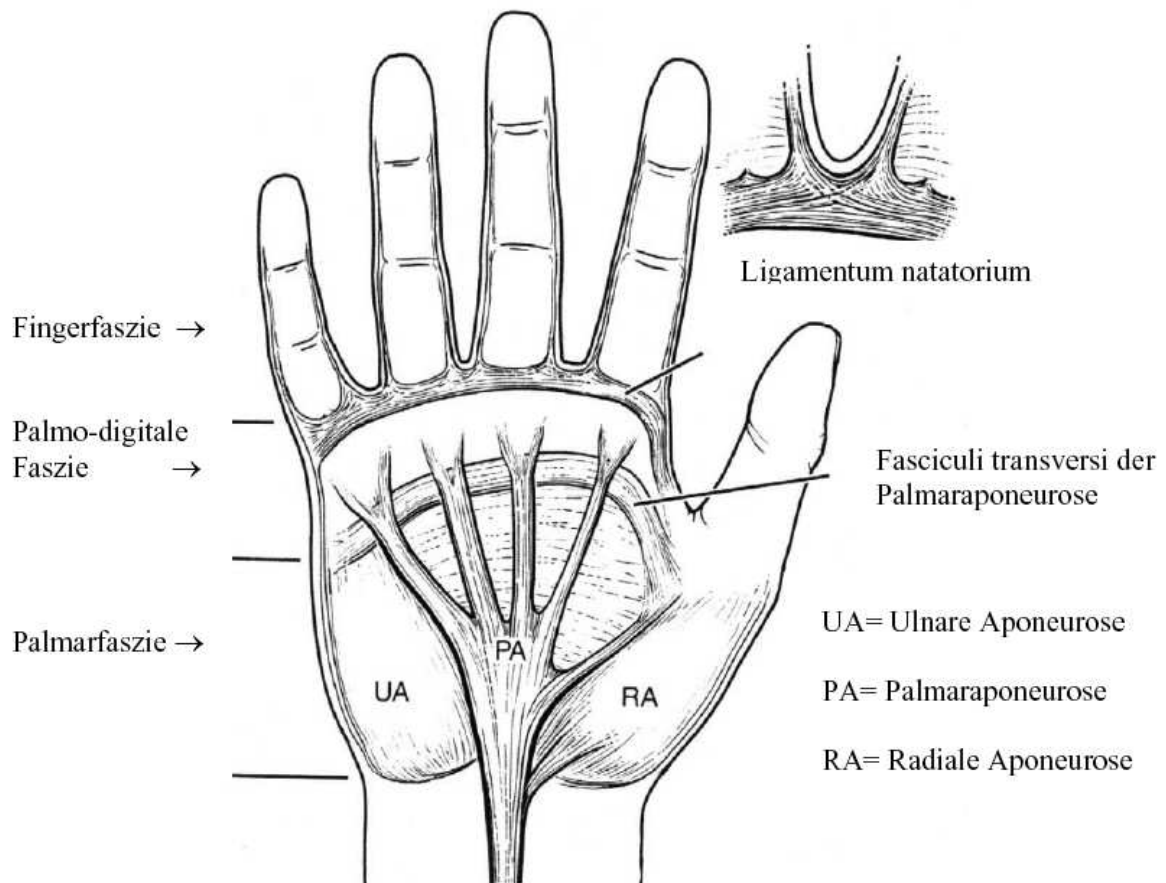


Abb. 2 Palmarfaszien-Komplex (schematische Darstellung), modifiziert nach Rayan aus „Dupuytren disease: Anatomy, pathology, presentation, and treatment“ (Rayan 2007)

Bei einer pathologischen Veränderung im Sinne einer Fibromatose kommt es zu knotigen und strangförmigen Zellproliferationen, die für den M. Dupuytren pathognomonisch sind. (McFarlane 1974, Rayan 1999) Zunächst ist die Ausbildung eines derben Knotens zu beobachten, der fest mit der Haut und tiefen fasziellen Strukturen verbacken ist. Das subkutane Fettgewebe wird dann durch das vermehrte Bindegewebe verdrängt und weist eine Druckatrophie auf (Martini 1985). Schließlich entwickelt sich ein Strang, der durch die fortschreitende Verkürzung der Palmaraponeurose zu einer Beugekontraktur der betroffenen Finger führt.

2.1.4. Klinik

Typischerweise tritt als erstes Symptom des M. Dupuytren eine Reliefstörung der distalen palmaren Haut auf. Vertikale Fasern (Grapow-Fasern), die eine Verbindung

zwischen Palmaraponeurose und Haut darstellen, verdicken sich zu Mikrosträngen und führen zu einer Adhäsion der Haut, was wiederum zu einer verminderten Verschieblichkeit gegenüber ihrer Oberfläche führt. Auch sind anfänglich Knoten tastbar, die bereits zu einer Extensionshemmung führen können. Die folgende Ausbildung eines Stranges führt schließlich zur zunehmenden Beugedeformität der betroffenen Finger und damit zum Vollbild der Dupuytren'schen Kontraktur. Es können alle Finger, bevorzugt aber die ulnare Seite, vom M. Dupuytren betroffen sein. So sind mit abnehmender Häufigkeit der Ringfinger, kleine Finger, Mittelfinger, gefolgt von Daumen und schließlich Zeigefinger betroffen (Dupuytren 1831, Guérin 1833, Rayan 2007). Eine besondere Bevorzugung einer Körperseite besteht nicht (Millesi 1981). Daten, die einen scheinbar häufigeren Befall der rechten Hand belegen, beziehen sich auf Studien, die an operierten Händen erhoben wurden und verdeutlichen daher lediglich die Präferenz der Arbeitshand bei der Wahl der primären Operationsseite. Häufig sind aber beide Hände betroffen.

Außerdem können an anderen Körperstellen Fibroblastenproliferationen in Form von ektopen Fibromatosen zusammen mit dem M. Dupuytren auftreten. So findet man an den Digiti II bis V Fingerknöchelpolster (knuckle pads), an der Fußsohle eine Plantarfibromatose (M. Ledderhose), am Penis die Induratio penis plastica (Peyronie-Krankheit) und an anderen Regionen des Körpers ähnliche Veränderung (Peyronie 1819, Ledderhose 1897).

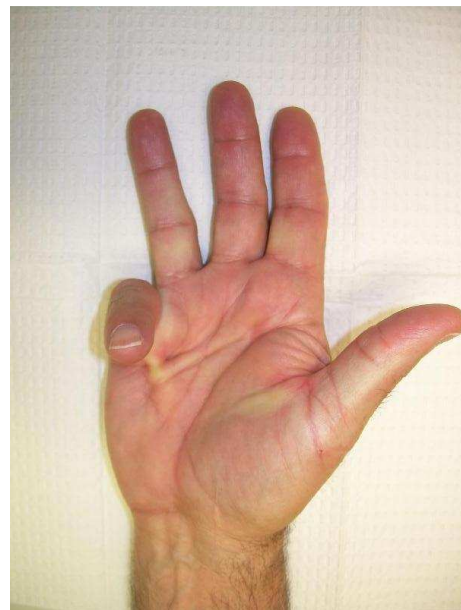


Abb. 3 Klinisches Erscheinungsbild des Morbus Dupuytren, aus www.eatonhand.com

Klinische Stadien nach Tubiana

Eine Einteilung der Schweregrade der Kontraktur liefert die Klassifikation nach Tubiana (Tubiana 1986). Bei ihr werden die Winkel der Streckhemmung der einzelnen Fingergelenke addiert und den entsprechenden Stadien zugeordnet:

Stadium 0:	Keine Streckhemmung, keine Läsion
Stadium N:	Knoten (Nodus), aber ohne Kontraktur
Stadium 1:	Summe der Streckdefizite an sämtlichen Fingergelenken beträgt insgesamt bis 45 Grad
Stadium 2:	46-90 Grad
Stadium 3:	91-135 Grad
Stadium 4:	Über 135 Grad

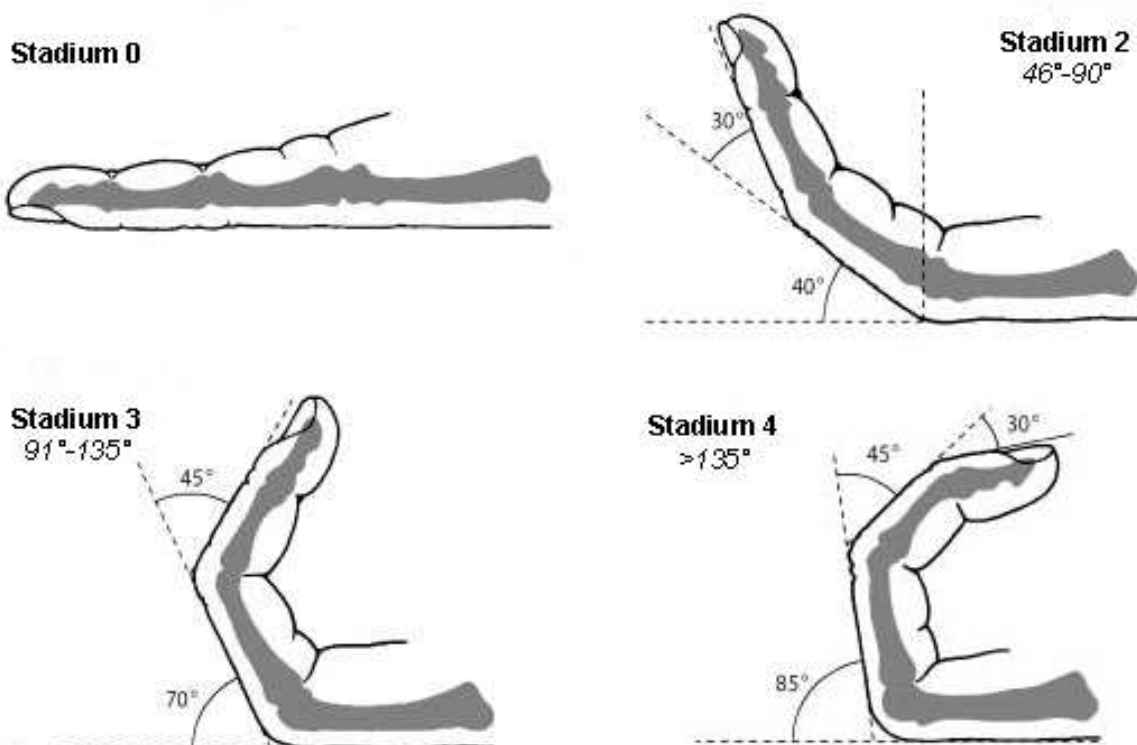


Abb. 4 Stadien nach Tubiana, modifiziert nach Brenner (Brenner et al. 2001)

2.1.5. Therapie

Konservative Behandlung

Es gibt ein breites Spektrum von konservativen Therapieansätzen, die sich an den verschiedenen Modellen zur Pathogenese orientieren. Zu nennen sind die lokale Applikation von Vitamin E, Steroiden, Allopurinol, Dimethyl-Sulfoxid (DMSO), die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, die Verwendung von Ultraschall und die Injektionstherapien mit Enzymen wie Trypsin und Hyaluronidase (Hueston 1971), mit Kalziumkanalblockern (Rayan et al. 1996) oder Kortikosteroiden (Ketchum und Donahue 2000). Keine dieser Therapien brachte jedoch den langfristig erhofften Erfolg. Die Injektion von Clostridien-Kollagenase wie von Hurst beschrieben (Hurst und Badalamente 1999), korrigierte immerhin bei 28 von 34 Patienten die Gelenkkontraktur auf eine normale Extension (0°). Allerdings besteht für alle konservativen Therapieansätze kein Konsens in der Behandlung des M. Dupuytren (Rayan 2007). Letztendlich bieten vor allem die neuen Erkenntnisse der Zellbiologie und der Wachstumsregulation durch Zytokine interessante Therapieaussichten. Hier muss noch weitere, intensive Grundlagenforschung betrieben werden, um eine konservative Behandlungsmethode mit guter Effizienz zu entwickeln, denn zum jetzigen Zeitpunkt beeinflusst die operative Behandlung immer noch besser den Verlauf der Erkrankung (Kloen 1999, Kopp et al. 2006).

Operative Behandlung

Die Indikation zur operativen Behandlung wird heute in aller Regel bei beginnender Kontraktur, also im Stadium 1 nach Tubiana (Tubiana 1986), gestellt. Die Therapie der Wahl ist hierbei die begrenzte Strangexzision (partielle Fasziektomie) (Abb.5). Die Resektionsgrenze stellt das erkrankte Gewebe einschließlich eines kleinen Sicherheitssaums dar (Freehafer und Strong 1963). Aufgrund der schlechteren postoperativen Ergebnisse werden nur noch in besonderen Fällen Verfahren wie perkutane Nadelfasziektomie, Dermatofasziektomie, Arthrodese oder in Fällen mit fortgeschrittener Kontraktur die Amputation durchgeführt (Colville 1983, Brotherston et al. 1994, Hueston 1969).

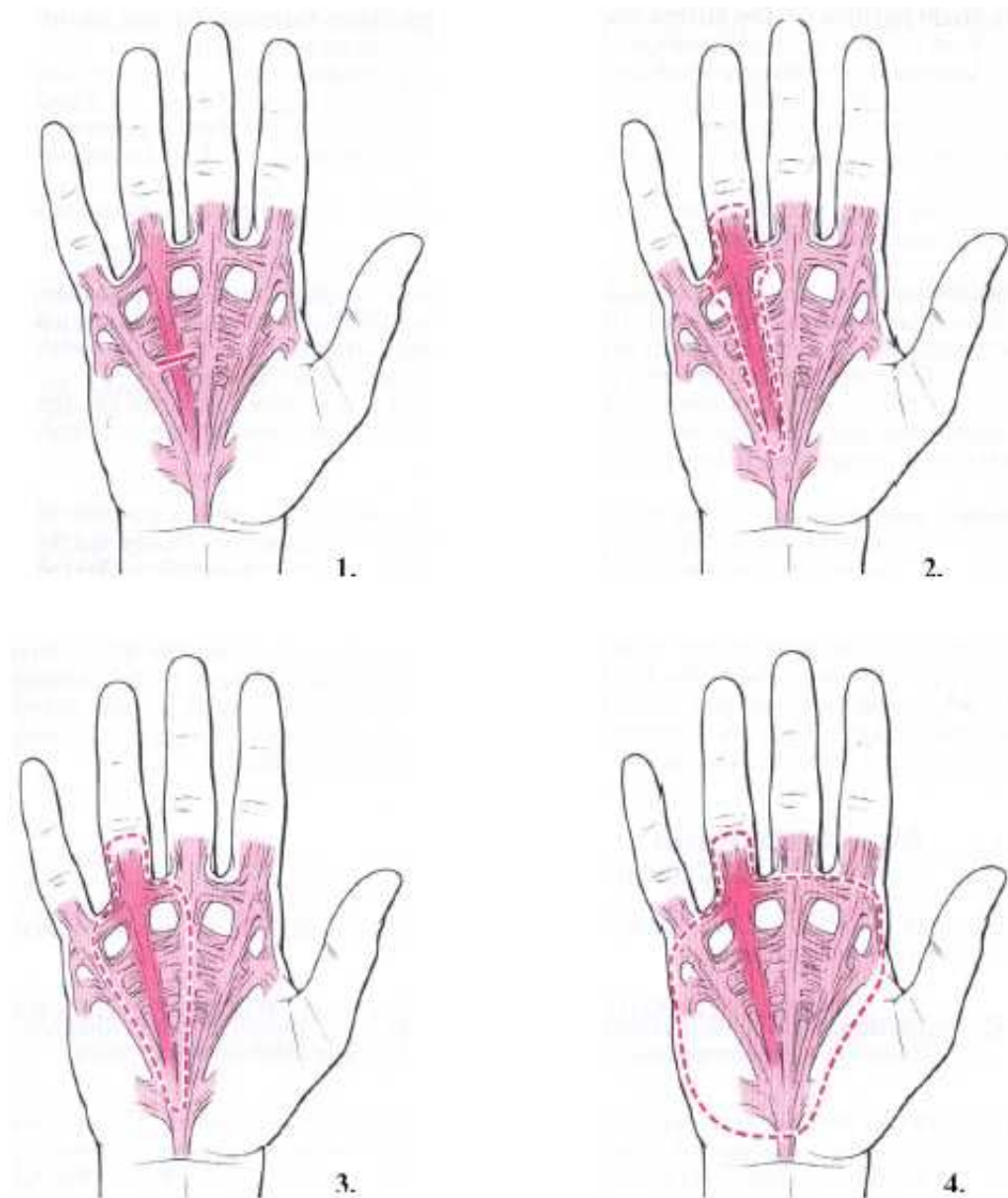


Abb. 5 Resektionsgrenzen in den einzelnen Operationsverfahren:

1. Fasziotomie, 2. lokale Exzision, 3. partielle Fasziektomie, 4. totale Fasziektomie, der Palmarfaszien-Komplex ist hier rosa der erkrankte Teil rötlich dargestellt, die Resektionsgrenzen sind mit gestrichelter Linie markiert, modifiziert aus (Henne-Bruns 2003)

2.1.6. Histologie

Stadien nach Luck

Bei der palmaren Fibromatose handelt es sich um einen aktiv zellulären Prozess, der durch Proliferation der Fibroblasten zu einer Vermehrung des Bindegewebes führt.

Diese Veränderungen werden von Luck (Luck 1959) auf histologischer Ebene in 3 Stadien unterteilt: Proliferations-, Involutions- und Residualstadium.

Stadium	Eigenschaften
Proliferationsstadium (Abb.6)	<ul style="list-style-type: none">▪ Hohe Zelldichte▪ niedriger Anteil: EZM▪ keine bestimmte Anordnung der Zellen▪ klinisch: fibromähnlicher tastbarer Knoten
Involutionsstadium (Abb.7)	<ul style="list-style-type: none">▪ Sinkende Zelldichte▪ Erhöhung des Anteils an EZM als Zeichen der Zellreifung▪ Ausrichtung der Zellen entlang der Zug- und Dehnungskräfte▪ klinisch: „Kontraktion“
Residualstadium (Abb.8)	<ul style="list-style-type: none">▪ deutlich geringere Zelldichte (fast bis auf das Niveau gesunder Sehne)▪ Myofibroblasten werden apoptotisch (Wilutzky et al. 1998)

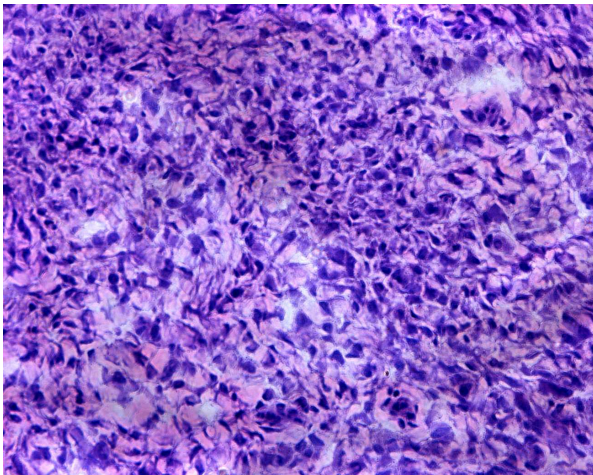


Abb. 6 histologisches Schnittbild des **Proliferationsstadiums (P)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

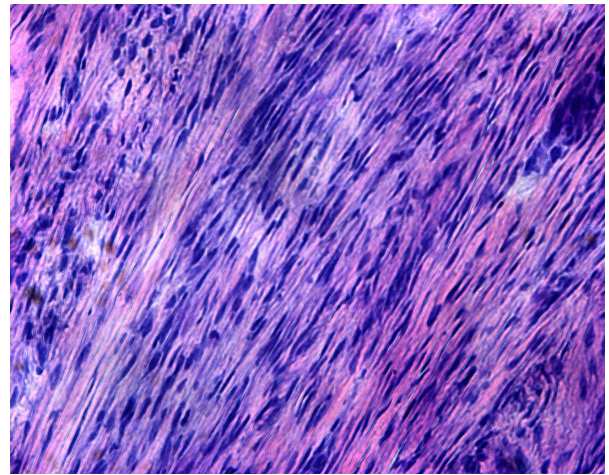


Abb. 7 histologisches Schnittbild des **Involutionsstadiums (I)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

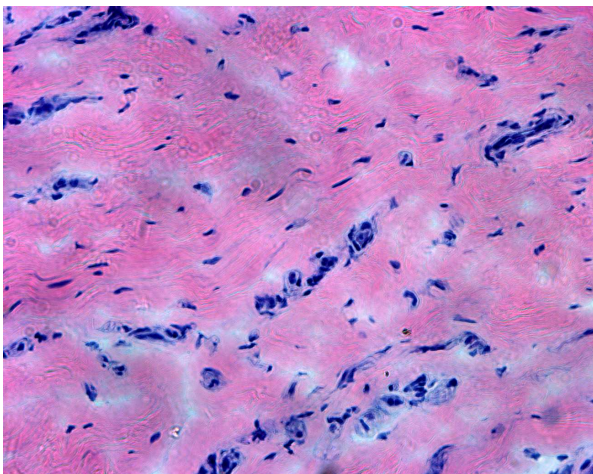


Abb. 8 histologisches Schnittbild des **Residualstadiums (R)**, H&E, Objektivvergrößerung: 10fach

Myofibroblasten

Myofibroblasten werden als die charakteristische Zellart des Morbus Dupuytren angesehen. Sie bilden in der Proliferationsphase nahezu die gesamte Menge an Zellen im aktiven Knoten. Auch in der Involutionsphase kommen Myofibroblasten vor, werden aber kleiner und richten sich entlang der Zugkräfte aus und sind im hypozellulären Residualstadium gar nicht mehr zu finden (Tomasek et al. 1999).

Der Terminus Myofibroblast geht auf Gabbiani (Gabbiani et al. 1971) zurück und unterstreicht die sowohl myozytären als auch fibrozytären Eigenschaften dieses Zelltyps. Hervorzuheben ist die Expression von alpha-glattmuskulärem Aktin (α -SMA)

- eine Isoform des Zytoskelettbausteins, der typischerweise in glatten Muskelzellen zu finden ist. Zusammen mit Myosin bildet α -SMA kontraktile Filamente, die an der Ausbildung der typischen Kontraktur des M. Dupuytren beteiligt sind (Tomasek et al. 1999). Der zelluläre Ursprung der Myofibroblasten ist noch nicht abschließend geklärt, doch machen immunhistologische Untersuchungen eine Entwicklung aus Fibroblasten wahrscheinlich (Schurch et al. 1990). Die Differenzierung zu Myofibroblasten, die Expression von α -SMA und die Entwicklung kontraktiler Kräfte kann durch die β 1-Isoform des Transforming Growth Factor (TGF- β 1) getriggert werden (Desmoulière et al. 1993). Myofibroblasten kommen auch in anderen Geweben vor, wie z.B. in hypertrophem Narbengewebe, in desmoplastischem Stromagewebe von Neoplasien, in der Umgebung von Mammainplantaten und in Granulationsgewebe. In letzterem wurden die Myofibroblasten auch zum ersten Mal beschrieben. (Baur et al. 1975, Rudolph et al. 1978, Sappino et al. 1988, Gabbiani et al. 1971).

2.1.7. Molekularbiologie

Wachstumsfaktoren wie FGF, EGF, PDGF, TGF- α , - β ₁, - β ₂ und - β ₃ sind im Zusammenhang mit dem M. Dupuytren bereits untersucht worden (Badalamente und Hurst 1999). In Zellkulturen von Fibroblasten aus Dupuytren-Gewebe konnte sowohl eine Stimulation von Proliferation als auch der (Kollagen)- Syntheseaktivität durch diese Zytokine gezeigt werden (Alioto et al. 1994). In immunhistologischen Studien konnte für TGF- β ₁ und - β ₃ eine positive Reaktion sowohl im gesundem als auch im erkrankten Gewebe nachgewiesen werden (Badalamente 1996). TGF- α , - β ₂, bFGF und PDGF konnten im erkrankten Gewebe im Proliferations- und Involutionsstadium nachgewiesen werden, nicht oder nur spärlich jedoch im Residualstadium und in gesundem Gewebe (Badalamente 1992, Berndt et al. 1995, Magro et al. 1997). Die letzteren werden daher auch in Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung des Krankheitsprozesses gebracht, obwohl dadurch nach wie vor kein ursächlicher Zusammenhang gefunden werden konnte. Allen histologisch untersuchten Wachstumsfaktoren war eine deutliche Akkumulation um Gefäße gemein. Eine erhöhte EGF-Konzentration wurde in Operationspräparaten des M. Dupuytren nachgewiesen, was eine Beteiligung an der Pathogenese auch für diesen Faktor nahe legt (Augoff et al. 2005).

2.2. Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Der Name „bone morphogenetic protein“ (BMP) beschreibt eine Gruppe von Proteinen, die ursprünglich aufgrund ihrer knorpel- und knocheninduzierenden Wirkung außerhalb des skelettalen Bereiches entdeckt wurden (Urist 1965). Heute sind weit mehr Wirkungen bekannt als die ektope Induktion von Knochen. Sie regulieren Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen in einer Vielzahl von Geweben und spielen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in der Aufrechterhaltung und Reparatur von adultem Gewebe eine Rolle (Miyazono et al. 2005).

BMPs gehören der TGF- β /BMP-Superfamilie an, zu der - neben den TGF- β s und BMPs - auch Aktivine/Inhibine, die Mullerian inhibiting substance (MIS) und weitere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (engl.: growth and differentiation factors, GDFs) gehören. Bislang sind über 30 BMPs bekannt. Sie bilden damit die größte Untergruppe in dieser Familie von Zytokinen (Ducy und Karsenty 2000). Die Wirkung wird durch transmembranale BMP-Rezeptoren (BMPR-I und BMPR-II) mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität realisiert. Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion über Smad Proteine, eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die nach Phosphorylierung in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Genen reguliert. In Abhängigkeit vom Zelltyp und anderen signalspezifischen Ko-Aktivatoren können sie sowohl induzierende als auch supprimierende Wirkung auf die Genexpression entfalten (Ducy und Karsenty 2000, Bengtsson 2007).

BMP-2

BMP-2 ist ein 32-kDa homodimeres Glykoprotein aus 114 Aminosäuren (siehe Abb.9).

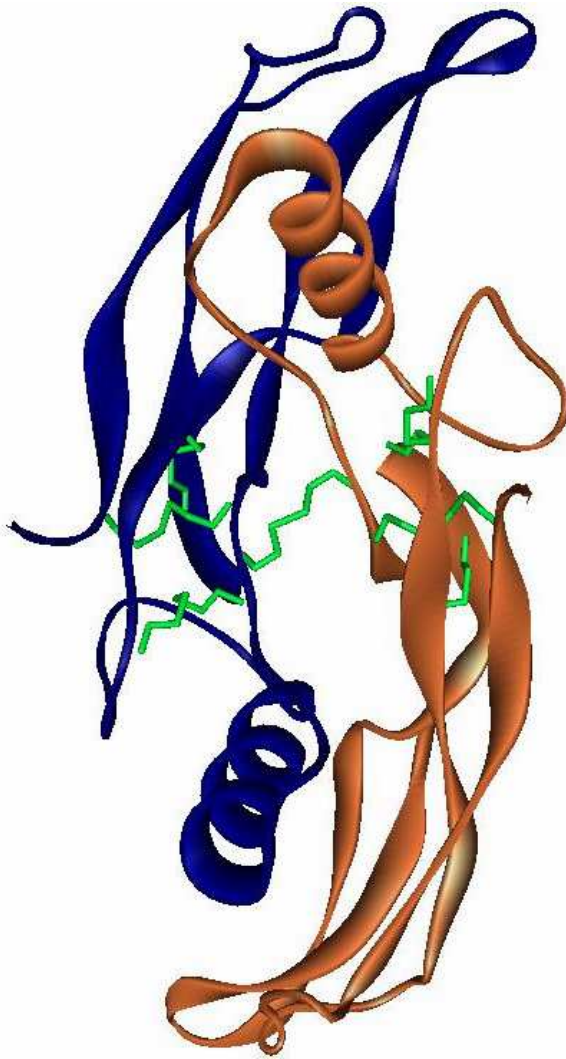


Abb. 9 BMP-2 (Kristallstruktur), aus (Scheufler et al. 1999)

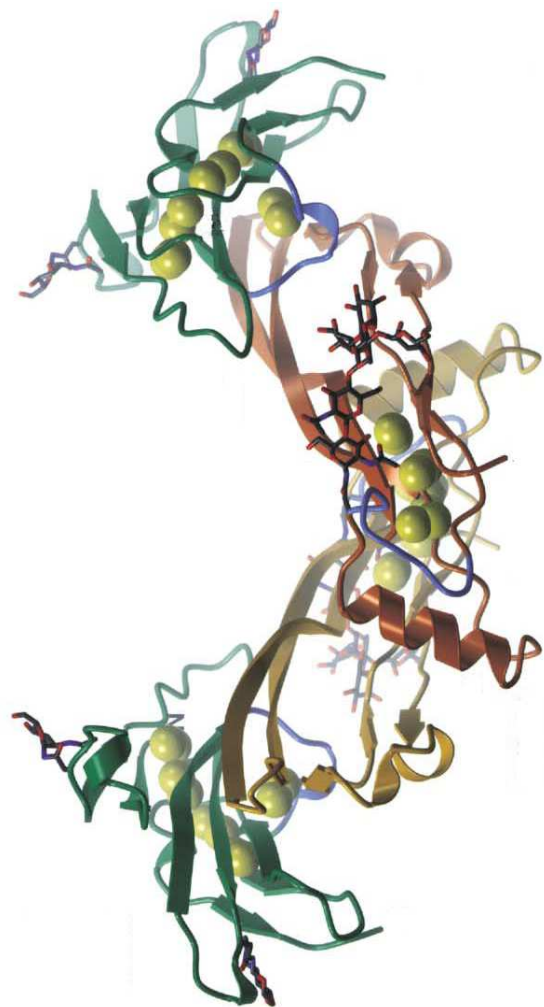


Abb. 10 BMP-7 (Kristallstruktur), aus (Greenwald et al. 2003)

Es spielt während der Embryogenese eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Myokards, des peripheren Nervensystems und der langen Röhrenknochen und Wirbelkörper. In adultem Gewebe wird es während der Knochenheilung exprimiert und wirkt hierbei osteoinduktiv (Ducy und Karsenty 2000). Im gesunden Knochen

kommt es hingegen nur in sehr geringer Konzentration vor (Riley et al. 1996). Auch ist eine Expression von BMP-2 in Prostatakarzinom, Osteosarkom, Pankreas- und Ovarialkarzinom zu finden (Harris et al. 1994, Murphy et al. 2001, Kleeff et al. 1999, Kiyozuka et al. 2001). Eine physiologische Rolle scheint ihm bei Aufrechterhaltung der Zellhomöostase in Blutgefäßwänden zuzukommen (Willette et al. 1999).

BMP-7

BMP-7 besteht aus 139 Aminosäuren (Abb.10) und wird in der Embryogenese während der Entwicklung des Herzens, des Darms, der Augen und Nieren verstärkt exprimiert (Ducy und Karsenty 2000). In den Nieren spielt BMP-7 auch in adulten Zellen noch eine entscheidende Rolle. Hier ist es an der Regeneration von Nierengewebe nach hypoxischen Schäden beteiligt. Ebenso kann es die profibrotische Wirkung von TGF- β attenuieren und somit die Entwicklung einer Fibrose - zumindest im Tierversuch - verhindern (Zeisberg et al. 2005). Außerdem kommt BMP-7 in Osteosarkomen und Prostatakarzinomen vor (Gobbi et al. 2002, Masuda et al. 2003).

3. Ziele der Arbeit

Bei der Entwicklung des M. Dupuytren spielen eine Reihe von Wachstumsfaktoren eine Rolle. Dennoch ist der Pathomechanismus bislang unklar. BMP-2 und BMP-7 sind zwei wichtige Vertreter der TGF- β Superfamilie und ihre Beteiligung an fibrotischen Veränderungen von Organen wie Lunge, Leber und Niere ist bereits belegt (Zeisberg et al. 2005, Tacke et al. 2007). In Zellkultur von Dupuytren Fibroblasten ist eine Expression dieser BMPs nicht nachweisbar (Shin et al. 2004).

Diese Arbeit soll daher klären, ob eine veränderte BMP-2 und BMP-7 Expression im Gewebe des M. Dupuytren im Vergleich zu normalem Gewebe vorliegt.

Darüber hinaus soll untersucht werden, inwieweit stadienabhängige Unterschiede innerhalb des erkrankten Gewebes nachzuweisen sind.

Eine immunhistologische Untersuchung soll die Verteilung der BMPs im erkrankten Gewebe untersuchen. Myofibroblasten stellen die aktive Form der Fibroblasten im Morbus Dupuytren dar. Eine Doppelmarkierung dieser Zellen mit den BMPs soll einen möglichen Syntheseort oder eine Effektorzellart aufdecken.

Ein eigener Kultivierungsversuch soll zeigen, ob sich das Expressionsverhalten der Zellen in vitro im Vergleich zum Nativgewebe ändert und inwieweit sich daher die Ergebnisse aus früheren Studien bestätigen lassen.

Der M. Dupuytren zeigt darüber hinaus histologisch und molekularbiologisch viele Ähnlichkeiten mit anderen fibrotischen Veränderungen und gilt daher als Modellerkrankung für Fibrosen, desmoplastische Stromareaktion bestimmter Tumoren und hypertrophe Narbenbildung, aber auch physiologische Wundheilung (Kloen 1999). Eine Untersuchung dieser Expression könnte auch in diese Prozesse neue Einblicke geben.

4. Materialien

4.1. Laborgeräte und Instrumente

Autoklav Systec V-120	Systec, Wettenberg
Begasungsbrutschrank INCO2	MEMMERT, Schwabach
Brutschrank, NCO2	MEMMERT, Schwabach
Digitalkamera AxioCam	Carl Zeiss, Jena
Eismaschine (FRIMON AF 80)	Scotsman, Mailand
Gefriergeräte:	
Gefriertruhe (-80°C)	Nunc, Wiesbaden
GS 801 (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen
Gefriermikrotom Leica CM 1100	Leica, Nussloch
Glasgefäße	Schottglas, Jena
Kühlschrank KT 1740	Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen
Löffel/Spatel aus Edelstahl	Carl Roth, Karlsruhe
Magnetrührer Typ MR 1000	Fa. Heidolph, Kelheim
Magnetrührer Variomag© Compact HP 1	H+P Labortechnik , Oberschleißheim
Magnetstabentferner	Carl Roth, Karlsruhe
Microflow Laminar Flow Workstation	Nunc, Wiesbaden
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss, Jena
Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Mikrowelle KOG-5747	Daewoo, Butzbach
RT-PCR: iCycler IQ©	Bio-Rad, München
pH-Meter HI 8014	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten:	
Research© 2.5, 10, 100, 1000, 5000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reference© 10, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reinstwassersystem TKA-LAB, Typ HP 6	TKA, Niederelbert
Spektralphotometer, Smart Spec™ 3000	Bio-Rad, München
Thermostat plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Waage:

Sartorius BP 1219

Sartorius, Göttingen

Sartorius KERN GS

Sartorius, Göttingen

Wasserbad

MEMMERT, Schwabach

Wasser-Filtrieranlage

TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP
6UV/VF

Zentrifuge :

mini Spin©

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

centrifuge 5804 R

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

4.2. Chemikalien

Albumin Fraktion V

Merck, Darmstadt

Chloroform

Merck, Darmstadt

DMEM

Sigma-Aldrich, München

Eosin

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Ethanol 70%

Apotheke im Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“
gGmbH, Eisenberg

Gentamycin

Sigma-Aldrich, München

Hämatoxylin nach Gill

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

Hyaluronidase

Sigma-Aldrich, München

Isopropanol

Merck, Darmstadt

Kollagenase P

Roche diagnostics, Rotkreuz (Schweiz)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)

Sigma-Aldrich, München

Xylol

Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

4.3. Puffer

PBS

10,1 mM Natriumhydrogenphosphat

1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat

2,7 mM Kaliumchlorid

137 mM Natriumchlorid

in Reinstwasser lösen und mit

5 N Natriumhydroxid auf pH 7,4 einstellen,

Endvolumen: 1 l, autoklavieren

Trispuffer (TBS)	60 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 90 g Natriumchlorid mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Albumin-Trispuffer	0,5 g Albumin Fraktion V 16,6 ml TBS

4.4. Antikörper

Anti BMP-2/4 IgG _{2B} (Wirt: Maus).....	Kat.Nr.: MAB355	R&D Systems™, Minneapolis (USA)
Anti BMP-7 IgG _{2B} (Wirt: Maus).....	Kat.Nr.: MAB3541	R&D Systems™, Minneapolis (USA)
Anti α-SMA IgG _{2A} (Wirt: Maus).....	Kat.Nr.: A2547	SIGMA™, Saint-Louis (USA)
Anti Maus IgG (Wirt: Ziege)..... (Blockierungs - Antiserum)	Kat.Nr.: M5899	SIGMA™, Saint-Louis (USA)
Fluorescein Anti-Maus IgG.....	Kat.Nr.: F2761	Molecular Probes™, Eugene (USA)
Alexa Fluor® 594 Anti-Maus IgG.....	Kat.Nr.: A11032	Molecular Probes™, Eugene (USA)
Maus IgG _{2B} (Isotype-Control).....	Kat.Nr.: MAB004	R&D Systems™, Minneapolis (USA)

4.5. Test Kits

Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden
ProLong Antifade Kit Antifade Kit	Molecular Probes, Göttingen
RNaseOut© Kit	Invitrogen™, Karlsruhe
SYBR© Green IQ Supermix	Bio-Rad, München
Trizol© Reagent	Invitrogen™, Karlsruhe

4.6. Verbrauchsmaterialien

Einmal – Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Einmalhandschuhe	Danz, Wetter

Fettstift: DakoCytomation-Pen©	Dako Deutschland, Hamburg
Objektträger Superfrost Plus, beschichtet	Menzel, Braunschweig
Petrischalen (unbeschichtet)	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	
10, 200, 1000	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
filter tip FT 10E, FT 200, FT 1000	Greiner Bio-One, Solingen
Platten im 96well-Format	Nunc, Wiesbaden
Polypropylengefäße 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
serologische Pipetten	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter (0,2µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Tissue-Tek© O.C.T. compound	Sakura Finetek GmbH, Heppenheim
Trockeneis	Chemiewerke, Leuna
Wägepapier	Carl Roth, Karlsruhe
Kulturflaschen 50ml mit „plug seal cap“	BD Falcon™, Franklin Lakes (USA)

4.7. Computer Software

Acrobat 7.0 Professional	Adobe Deutschland, München
AxioVert 4.4	Zeiss, Jena
AxioVision Viewer V02-2000	Zeiss, Jena
EndNote 6	Thomson ISI ResearchSoft, Philadelphia
iCycler	Bio-Rad, München
Microsoft Office 2000	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Photoshop 6.0	Adobe Deutschland, München
SigmaPlot 8.0	Systat Software, San José (USA)
SigmaStat 3.0	Systat Software, San José (USA)

5. Methodik

5.1. Gewinnung von Gewebeproben

Dupuytrogewebe

Als Untersuchungsmaterial für pathologisch verändertes Gewebe dienten Resektate von 12 Patienten mit einem M. Dupuytren. Die Indikation für die Operation wurde bei beginnender Kontraktur (Stadium nach Tubiana ≥ 1) gestellt.

Die Operation wurde in Form einer partiellen Fasziektomie durchgeführt. Dazu erfolgte ein zick-zack-förmiger Hautschnitt in der Hohlhand und die Haut wurde anschließend mit subkutanem Fettgewebe von der Palmaraponeurose (PA) scharf abpräpariert. Proximal wurde die PA unterfahren und durchtrennt. Seitlich wurde sie von den Thenar und Hypothenarmuskeln unter Schonung des Nerven Gefäßbündels freigelegt, am Stiel mit einer scharfen Klammer gefasst und gehoben. Dadurch konnte sie unter Sicht vom darunter liegenden Gefäß-Nerven-Bündel distalwärts getrennt werden. Im distalen Hohlhandbereich wurde die PA vom Querband bis auf den Fingerstrang abgelöst. Der Kontrakturstrang wurde anschließend scharf schrittweise unter ständiger Darstellung des Gefäß-Nerven-Bündels des Fingers abpräpariert. Nach Entfernung des Kontrakturstranges ließ sich der Finger meist wieder voll strecken. Waren mehrere Finger befallen, so erfolgte die Resektion in dieser Weise auch für die restlichen befallenen Finger. Diese Operation ist von erfahrenen Ärzten der orthopädischen Klinik des Rudolf-Elle-Krankenhauses durchgeführt worden. Für die Weiterverwendung der Resektate lag von allen Patienten eine Einverständniserklärung vor. Außerdem wurde ein Antrag (Nr.:1833-07/06) bei der Ethikkommission der Universität Jena zur Begutachtung der ethischen Durchführbarkeit der Untersuchung gestellt und positiv beschieden (siehe Anhang).

Gesunde Proben

Gesunde Proben wurden von 6 Patienten gewonnen, die aufgrund eines Karpal-Tunnel-Syndroms (KTS) an der Hand operiert wurden, wobei Palmaraponeurose entnommen werden konnte. Hierfür lagen wiederum ein Ethikantrag (siehe oben) und die Einverständniserklärung der Patienten zur Verwendung des Resektionsmaterials für wissenschaftliche Zwecke vor.

5.2. Aufarbeitung des Gewebes

Direkt nach der Entnahme ist das Präparat in einem sterilen Behälter und mit Wassereis gekühlt zur Weiterverarbeitung innerhalb von 10 Minuten ins Labor transportiert worden. Da eine molekularbiologische Untersuchung der Proben im späteren Verlauf geplant war, sind die folgenden Arbeitsschritte unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt worden. Dies diente dazu, die Degradation der RNA durch RNA-spaltende Enzyme (RNasen) möglichst zu verhindern. Deswegen wurden die Arbeitsplatte und sämtliche Instrumente direkt vor ihrer Benutzung abgeflammt. Zum Zertrennen wurde ein steriles Einweg-Skalpell verwendet. Außerdem wurden während der gesamten Arbeit an den Proben Einweg-Handschuhe getragen.

Die Proben sind binnen weniger Minuten auf einer gekühlten Arbeitsplatte von Fettgewebe frei präpariert und auf die Größe eines Objektträgers (ca. 2 cm lang) zurechtgeschnitten worden. Die so entstandenen Teile sind wiederum in zwei möglichst gleichartige Teile zerschnitten worden um später vergleichbare Gewebsanteile für die verschiedenen Versuche zur Verfügung zu haben. Ein Teil wurde sofort für die spätere molekularbiologische Untersuchung mittels PCR in einem 2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf™) auf -80°C eingefroren. Der andere Teil ist zur histologischen Untersuchung in Tissue Tec® eingebettet worden. Tissue Tec® ist eine Lösung aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen, die als Umgebungsmatrix zum Schneiden dient und während des Färbens keine Rückstände auf dem Objektträger hinterlässt. Die Proben sind bis zum Färbeprozess bei -80°C gelagert worden.

Aufgrund der geringen Größe der gesunden Gewebeproben konnten keine zwei korrespondierenden Hälften gebildet werden und mussten getrennt untersucht werden. Daher wurden vier Proben allein für die PCR und zwei Proben sind für die histologische Untersuchung verwendet worden.

5.3. Histologische Stadieneinteilung

Die Auswahl der Proben für die Untersuchung erfolgte in Abhängigkeit des histologischen Stadiums (Luck 1959). Dazu wurde eine H&E Übersichtsfärbung angefertigt.

5.3.1. Herstellung von Gewebeschnitten

Mit dem Gefriermikrotom (Kryostat©) wurden bei -30°C, 8 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf SuperFrost© Objektträger verbracht und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur antrockneten. Die Schnittkante der Proben wurde abschließend mit Tissue Tec© versiegelt, sodass sie für die folgende Immunhistologie wieder zu Verfügung stand.

5.3.2. H&E Übersichtsfärbung

Zunächst wurden die Schnitte zur besseren Flüssigkeitsaufnahme mit PBS angefeuchtet. Zur Färbung wurden sie 10 min in Hämatoxylin nach Gill getaucht und in einem zweiten Schritt 10 min mit Eosin (10 g in einem Liter a.d. verdünnt) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe in ein organisches Milieu überführt, zweimal mit Xylol gewaschen und dann mit Cananda Balsam eingedeckt.

5.3.3. Auswertung

Nach 24 h erfolgte die Stadieneinteilung am Mikroskop. Es wurden 4 Stadien festgelegt: Proliferations-, Involutions-, Residualstadium und zur klareren Einteilung ein Übergangsstadium von Proliferation zu Involution (Luck 1959). Diese Einteilung ist mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. K. Katenkamp vom Institut für Pathologie in Jena bestätigt worden. Für die folgenden Versuche sind nunmehr lediglich die Proben verwandt worden, die einen Anteil des jeweiligen Stadiums von mindestens 50% der gesamten Fläche des Schnittes aufwiesen. So sollte sichergestellt werden, dass evtl. erkennbare Veränderungen auch auf ein bestimmtes Stadium zurückzuführen sind.

5.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = englisch: polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Als Amplikon kann cDNA dienen, die in der Reverse-Transkriptase-Reaktion aus mRNA gewonnen wird und Rückschlüsse auf die Genexpression eines bestimmten Proteins erlaubt.

5.4.1. RNA Extraktion

Alle Arbeiten erfolgten unter RNase-freien Bedingungen. Die RNA ist aus Gewebearealen extrahiert worden, die im Vorfeld einem bestimmten histologischen Stadium zugeordnet werden konnte. Hierzu ist TRIZOL® Reagent (invitrogen™) verwendet worden. Die Probe wurde in 1ml TRIZOL® in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf™) aufgenommen. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgte dann mit einer RNase-freien Schere. Die nachfolgenden Schritte der RNA-Isolation erfolgten nach Hersteller-Protokoll.

Anschließend ist eine photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Spektralphotometer (Smart Spec® 3000) durchgeführt worden. Diese dient dazu, möglichst gleiche Mengen an RNA für die Reverse-Transkriptase-Reaktion und damit vergleichbare Ausgangsmengen für die anschließende PCR zu verwenden.

5.4.2. Reverse-Transkriptase-Reaktion

Die Herstellung eines komplementären DNA-Stranges (cDNA) zu einer mRNA-Matrix erfolgt durch reverse Transkription.

Pro Ansatz sind nicht mehr als 1,7 µg RNA verwendet worden. Für die Reaktion wurde der Omniscript® RT Kit (Qiagen™) und der RNaseOUT® Kit (invitrogen™) verwendet. Die Proben wurden nach der RNA Isolation für 5 min. bei 65°C denaturiert. Währenddessen wurde der folgende Reaktionsansatz für 20 µl RNA-Lösung vorbereitet: 2 µl RT Buffer (Omniscript®), 2 µl dNTP Mix (1 mM/dNTP), 2 µl Oligo dT, 0,25 µl RNase Inhibitor, 1 µl reverse Transkriptase (2 Units) und 2,75 µl H₂O. Danach erfolgte die Inkubation von 10 µl RNA Probe zusammen mit 10 µl des Reaktionsansatzes für 60 min bei 37°C. Die so entstandenen cDNA-Proben wurden

10fach mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert.

5.4.3. Real Time PCR

Die Real Time PCR ist ein Verfahren, bei dem nach jedem Replikationszyklus eine Mengenbestimmung des Amplikons durchgeführt werden kann. Hierbei wird ein Fluoreszenz-Farbstoff zugegeben, der doppelsträngige DNA bindet, wodurch eine Konformationsänderung seine fluoreszierenden Eigenschaften verstärkt. Dieses photometrisch detektierte Fluoreszenzsignal kann als proportional zur bereits amplifizierten DNA-Menge angesehen werden. Da verschiedene Stadien betrachtet wurden und sich in diesen Stadien die Genexpression in ihrer Höhe unterscheiden kann, wurde auf die reine Endpunktbestimmung der konventionellen PCR verzichtet. Stattdessen sind die Genexpressionen quantitativ mittels Real-Time PCR ermittelt worden.

Vorbereitung

9,5µl cDNA-Probe wurden mittels einer 10µl Eppendorf-Pipette mit Filter-Tips© in eine 96well Platte (Nunc™) pipettiert und anschließend der vorbereitete Master Mix, bestehend aus: 10µl SYBR-Green©, und jeweils 0,3µl upstream bzw. downstream-Primer zugegeben.

Als Primer wurden:

GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGA CCTGCTTCACCACCTTCTTG
BMP-2	GGGAAAACAACCCGGAGATT TTAAGGCGTTTCCGCTGTTT
BMP-7	TTTGGGGCCAAGTTTTTCTG ACAGGAACTTCCGGGTCAAT

verwendet.

Um Abweichungen auszuschließen, die durch Schwankungen in der DNA-Konzentration entstehen, wurde die Expression von GAPDH quantitativ mitbestimmt. GAPDH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein Glykolyse-Enzym, das konstitutiv in etwa gleich bleibender Höhe in jeder Zelle exprimiert wird. Das Gen wird daher als „house-keeping“-Gen bezeichnet. Die Expression von BMP-2 und BMP-7 wurde auf die der GAPDH normalisiert und als Vielfaches bzw. Teil dieser angegeben

Reaktion

Die Amplifizierung fand im iCycler® (BioRad™) statt. Alle PCR-Protokolle begannen mit einer initialen Denaturierung bei 95°C für 3 min, um die Doppelstrangbildung der DNA aufzulösen. Im Anschluss daran folgte die Anlagerung - das Annealing - der Primer. Die dafür erforderliche Temperatur ist primerspezifisch und lag bei den hier verwendeten Primern für BMP-2 und BMP-7 bei 60°C und für GAPDH zwischen 60-65°C, sodass sämtliche Protokolle mit 60°C durchgeführt werden konnten. Die darauf folgende Temperaturerhöhung auf 72°C stellt das Aktivitätsoptimum der verwendeten Taq-Polymerase für die Elongation dar. Daraufhin wurde die DNA erneut mit 94°C denaturiert. Diese drei Temperaturstufen dauerten jeweils 20 Sekunden und wurden 40mal durchlaufen bevor eine Schmelzkurve erzeugt wurde, die Aufschluss über Reinheit und Größe der Produkte (Amplifikate) gibt. Hierzu wird das Reaktionsgemisch von 60°C ausgehend in 0,5 K-Schritten, je 10 Sekunden lang auf 95°C erhitzt und bei jedem Schritt photometrisch der Gehalt an doppelsträngiger DNA bestimmt. Da die Doppelstränge abhängig von ihrer Länge in einem bestimmten Temperaturintervall vollständig denaturieren, erlaubt dieses „Schmelzen“ Rückschlüsse auf die Länge der Produkte und damit auf deren Reinheit.

5.4.4. Auswertung

Zur Quantifizierung wurden cDNA Proben des jeweiligen Gens mit definierten Konzentrationen mitbestimmt. Dazu wurden zunächst 8 Verdünnungen der cDNA (1ng/µl) von 10^{-1} bis 10^{-8} ng/µl (Probenstandards) erstellt. Anschließend konnte mithilfe des Programms iCycler® eine Standardkurve erstellt werden, anhand derer sich die Ausgangsmenge der DNA in den Untersuchungsproben errechnen ließ. Diese Ausgangsmenge wurde in Anzahl der Kopien zu Beginn der PCR (sog. starting quantity = SQ) angegeben. Die SQ-Werte der BMP Bestimmung wurden zu denen

der GAPDH ins Verhältnis gesetzt, um, unabhängig von der tatsächlich eingesetzten DNA Menge, Aussagen über die Höhe der Genexpression machen zu können. Das Verhältnis SQ-BMP/SQ-GAPDH wurde im Folgenden mit SigmaStat© statistisch verwertet. Proben deren Schmelzkurve nicht mit denen der Standards korrelierte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

5.5. Immunhistologie

Die Immunhistologie ist ein Verfahren zur Darstellung von bestimmten Proteinen im Gewebe über eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei kommt zunächst ein Antikörper zum Einsatz, der hochselektiv an eine Zielstruktur (antigene Determinante) bindet und wiederum durch einen Sekundärantikörper detektiert werden kann, welcher den Primärantikörper hochselektiv bindet. Dieser Sekundärantikörper kann mit Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) gekoppelt sein, die die Detektion dieser Komplexe und damit indirekt der Zielstrukturen ermöglichen.

Doppelmarkierung

Die Doppelmarkierung ermöglicht die Darstellung von zwei unterschiedlichen Antigenen in einem Schnittpräparat. Dazu müssen die Primärantikörper aus unterschiedlichen Tierspezies verwendet werden, um eine selektive Detektion mit entsprechenden Sekundärantikörpern zu gewährleisten. Die einzelnen Inkubationsschritte (siehe oben) werden hierzu analog zur Einzelmarkierung, jedoch nacheinander, durchgeführt. Sind Antikörper aus unterschiedlichen Tierspezies nicht verfügbar, besteht die Möglichkeit, nach der ersten Markierung, d.h. nach Bindung des ersten Sekundärantikörpers, die verbleibenden Bindungsstellen des Primärantikörpers abzusättigen, sodass die zweite Markierung unbeeinflusst von der Ersten stattfinden kann. Zur Blockierung kann beispielsweise ein Antiserum verwendet werden, das in Ziegen durch Immunisierung mit Maus IgG entwickelt wurde und daher spezifisch Maus IgG bindet.

5.5.1. Herstellung von Gewebeschnitten

Die Schnitte sind wie in 5.3.1. beschrieben angefertigt worden. Die Auswahl der Präparate erfolgte nach histologischen Kriterien entsprechend der Auswahl für die PCR (siehe 5.3.3.)

5.5.2. Vorbehandlung

Nach 5minütigem Anfeuchten mit PBS zur besseren Flüssigkeitsaufnahme folgte eine Vorbehandlung mit 1% Hyaluronidase, Sigma™ (1,5 mg Hyaluronidase in 1500 µl PBS). Die Spaltung von Hyaluronsäure - ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, das in allen Bindegeweben und Stützgeweben vorkommt - lockert dieses Gewebe auf und sorgt somit dafür, dass spezifische Oberflächenantigene erkennbar werden (Heinzeller 2001).

5.5.3. Doppelmarkierung (BMP und α -SMA)

BMP-2/4

Die Gewebeschnitte sind dann über Nacht bei 4°C mit einem monoklonalen Maus Anti-human BMP-2/4 Antikörper (AK) (R&D systems™) inkubiert worden, der zuvor 20fach in 3% Albumin-Trispuffer verdünnt wurde. Im Anschluss daran erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen für 3 h die Inkubation mit einem Anti-Maus Sekundär AK (AlexaFluor 594®, MolecularProbes™), der den Fc-Teil des BMP-2/4 AK spezifisch bindet. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der aus Ziegen stammt und mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt wurde. Er wurde zuvor 100fach in 3% Albumin-Trispuffer verdünnt.

Die folgenden Arbeitsschritte sind alle unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt worden, um ein vorzeitiges Ausbleichen des nun gebundenen Fluorochroms zu vermindern.

Es erfolgte anschließend die Blockierung der noch freien Bindungsstellen der Primärantikörper. Hierzu wurde Anti-Maus IgG (Sigma™) in 10facher Verdünnung mit PBS verwendet und über 3 h inkubiert. Danach ist ein ausgiebiges Waschen (10x10 min) notwendig, um sicherzustellen, dass nur gebundenes Blockierungs-IgG auf dem Schnitt zurückbleibt und keine Färbungsartefakte entstehen. Nun erfolgte die Inkubation über Nacht mit dem 2. Primär AK gegen Alpha-smooth muscle actin

(Sigma™). Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) ist ein Zytoskelettbestandteil von glatten Muskelzellen sowie Myofibroblasten und kann somit zur Identifizierung dieser Zellen dienen. Der Antikörper ist ein monoklonaler Maus Anti-human α -SMA AK, der zuvor 300fach in 3% Albumin-Trispuffer verdünnt wurde. Anschließend wurde für 3h mit dem 2. Sekundär Anti-Maus AK (Fluorescein grün®) inkubiert. Dieser wurde aus Ziegen entwickelt und ist mit einem grünen Fluorochrom gekoppelt.

Zwischen den einzelnen Schritten mussten jeweils Waschungen (5x5 min) mit PBS erfolgen, um Verunreinigungen bzw. nicht komplexierte Antikörper zu entfernen, die sonst artifizielle Fluoreszenzen erzeugen würden.

Eine anschließende Kernfärbung von 5 min mit DAPI (Sigma™) (0,5 μ g/ml a.d.) diente der besseren Identifikation einzelner Zellen. Nach der Kernfärbung wurde nach ausgiebigem Waschen mit PBS nochmals mit a.d. gewaschen, um ein Auskristallisieren von Puffersalzen zu verhindern. Nach der Lufttrocknung erfolgte die Eindeckung mit ProLong Anti-Fade Kit® (MolecularProbes™).

BMP-7

Die Markierung von BMP-7 erfolgte durch Inkubation mit einem monoklonalen Maus Anti-human BMP-7 AK (R&D Systems™) in 50facher Verdünnung mit 3% Albumin-Trispuffer über Nacht. Alle anderen Arbeitsschritte sind analog zu denen der BMP-2/4 Markierung.

5.5.4. Kontrollen

Um unspezifische Bindungsreaktionen der Primärantikörper auszuschließen, wurde eine Isotypen-Kontrolle durchgeführt. Hierbei werden die Schnitte lediglich mit isotypenspezifischen Fc-Teilen (R&D Systems™) der entsprechenden Primär-Antikörper inkubiert und anschließend der Sekundärantikörper hinzugegeben. Des Weiteren wurde die Doppelfärbung dadurch verifiziert, dass vollständige Einzelfärbungen mit BMP bzw. α -SMA durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der Doppelfärbung abgeglichen wurden.

5.5.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgte 24h später am Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 200M, ZEISS™). Unter Anregung mit Licht mit einer Wellenlänge von 546 nm bzw. 470 nm kam es in Regionen mit BMP-Vorkommen zu roter, bzw. bei α -SMA-positiven Zellen zu grüner Fluoreszenz. Zellkerne zeigten eine blaue Fluoreszenz unter Anregung mit Licht von 365nm Wellenlänge. Es wurden in einer Region alle drei Farbstoffe angeregt und mit einer Kamera (AxioCam HR©, Zeiss™) diese Mehrfachbelichtungen aufgenommen. Dadurch ist ein Übereinanderlegen der Bilder möglich, was eine Aussage über eine evtl. Ko-Lokalisation erlaubt. Die Isotypen-Kontrollen sind mit denselben Belichtungszeiten, wie die der Proben belichtet worden.

Die Einzelmarkierungen sind mit den Doppelmarkierungen auf Übereinstimmung überprüft worden.

5.6. Zellkultur

Die Expansions-Zellkultur ist ein Kultivierungsverfahren, bei dem Zellen aus nativem Gewebe in einem künstlichen Medium dazu gebracht werden, aus dem Gewebeverband herauszuwachsen und sich zu vermehren. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit der Charakterisierung der Dupuytren-Zellen. Darüber hinaus kann untersucht werden, wie die Genexpression der Zellen in Kultur ist und wie sich diese von der im Nativgewebe unterscheidet.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Eingesetzte Instrumente wurden hierzu autoklaviert oder mit Alkohol desinfiziert. Zellkulturmedien können weder hitzesterilisiert noch mit Alkohol behandelt werden. Um auch hier Keimfreiheit zu gewährleisten, wurden diese mit 0,2 μ m-Filtern steril filtriert und ein Antibiotikum (Gentamycin) zugesetzt.

5.6.1. Vorbehandlung

Die Probe wurde steril und mit Wassereis gekühlt vom OP ins Labor gebracht. In einer Petri-Schale sind etwa 1 mm³ große Gewebestücken mit einem Skalpell und Pinzette angefertigt worden, die anschließend mit Kollagenase P® (ROCHE

diagnostics™) im Wasserbad (37°C) für 10 min vorverdaut wurden. Dies dient dem Aufschließen der EZM zum erleichterten Auswachsen der Zellen.

5.6.2. Kultivierung

Die Aussaat der zerkleinerten Gewebestückchen erfolgte in 50 ml Kulturflaschen (BD- Falcon™). Als Kulturmedium ist „Dulbecco`s modified eagle`s medium“ F-12 (DMEM F-12) mit 20% fetalem Kälberserum (FKS) verwendet worden, d.h. 10 ml FKS und 40 ml DMEM F-12. Damit sind die Gewebestückchen zunächst nur benetzt worden, um ein Anwachsen am Boden der Kulturflasche nicht zu gefährden. Ein vorsichtiges Absaugen und erneutes Benetzen erfolgte 2täglich. Ab dem 5. Tag ist die Kulturflasche mit 5 ml Medium einheitlich befüllt worden. Das Medium ist im Folgenden 3täglich gewechselt worden.

5.6.3. Auswertung

Am 17. Tag erfolgte die Einteilung der Kulturen nach zellmorphologischen Kriterien (Mollenhauer und Bayreuther 1986) am Phasenkontrastmikroskop (AxioVert 200M, ZEISS™). Die Kulturen wurden mit einem Folienstift an der Unterseite der Kulturflasche entsprechend der Einteilung markiert. Anschließend ist die Oberseite der Flasche vorsichtig abgehoben worden, um Zugang zu den Zellen zu bekommen. Durch Auftragen und anschließendes Abpipettieren von ca. 100 µl Trizol© auf die Kultur, ließen sich die Zellen auflösen und damit ihre RNA gewinnen. Eine vorherige Umrandung mit einem Fettstift (Dako™) verhinderte das Vermischen der Zellen der einzelnen Kulturen. Die Isolation der RNA und die anschließende statistische Auswertung erfolgte wie in 5.4.1 - 5.4.4. beschrieben.

Da es bei diesem Versuch lediglich um die prinzipiellen Verhältnisse der BMP-Expression in der Zellkultur ging, wurde auf die mehrmalige Wiederholung der Versuche verzichtet.

6. Ergebnisse

6.1. Stadieneinteilung

Es wurden Proben in folgenden Stadien untersucht. Die Anzahl (N) der untersuchten Proben ist jeweils mit aufgeführt.

Stadium	Eigenschaften	Anzahl, N
P (Proliferation)	-hohe Zelldichte -niedriger Anteil: EZM -keine bestimmte Anordnung der Zellen -klinisch: fibromähnlicher tastbarer <u>Knoten</u>	3
P-I (Übergang)	-hohe Zelldichte -beginnende Ausrichtung der Zellen	3
I (Involution)	-sinkende Zelldichte -Erhöhung des Anteils an EZM als Zeichen der Zellreifung -Anordnung der Zellen entlang der Zugrichtung -klinisch: „Kontraktion“	3
R (Residualstadium)	-deutlich geringere Zelldichte (fast bis auf das Niveau gesunder Sehne) -Myofibroblasten werden apoptotisch (Wilutzky et al. 1998)	3
Ref. G (gesunde Referenzproben)		4

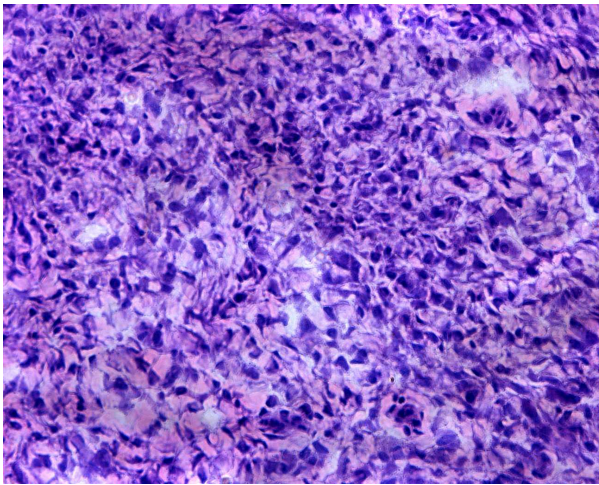


Abb. 11 histologisches Schnittbild des **Proliferationsstadiums (P)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

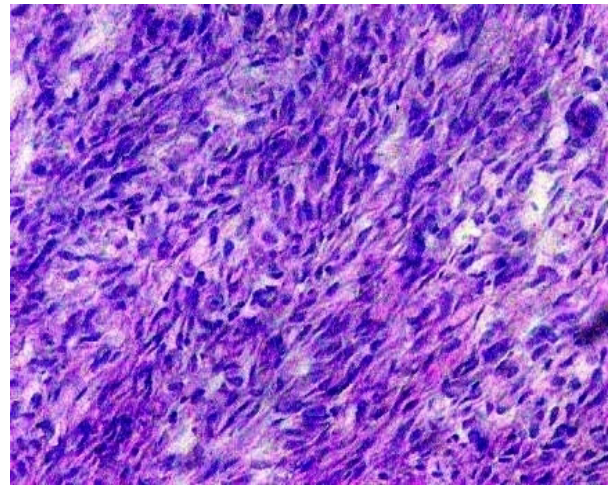


Abb. 12 histologisches Schnittbild des **Übergangsstadiums (P-I)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

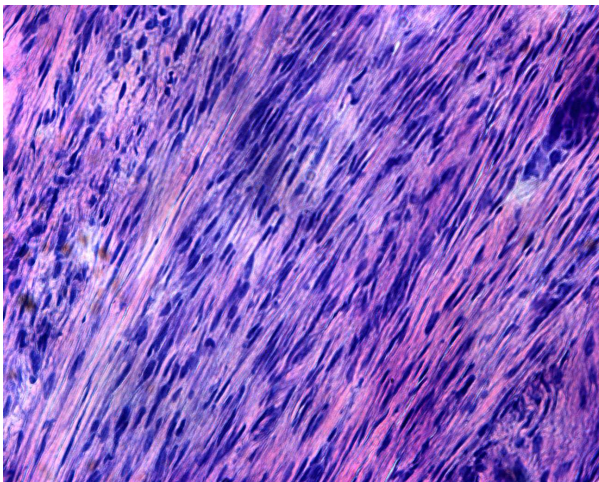


Abb. 13 histologisches Schnittbild des **Involutionsstadiums (I)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

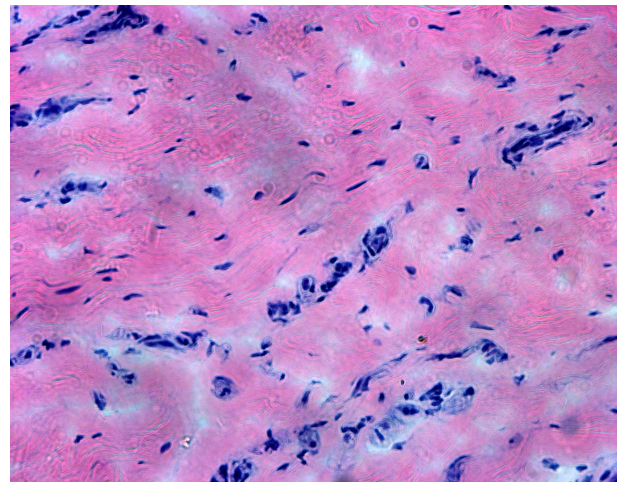


Abb. 14 histologisches Schnittbild des **Residualstadiums (R)**, H&E, Objektivvergrößerung: 20fach

6.2. Polymerase-Kettenreaktion

Um die Höhe der Synthese von spezifischer mRNA in den einzelnen Stadien zu bestimmen, wurde die quantitative RT-PCR durchgeführt. Mit Probenstandards wurden sog. Standardkurven erstellt, anhand derer sich die Ausgangsmenge der

mRNA-Moleküle (starting quantity = SQ) errechnen ließ. Diese wurde auf das mRNA-Niveau von GAPDH in den einzelnen Proben normalisiert.

BMP-2

Die Höhe der BMP-2 Expression im Dupuytrogewebe gegenüber dem Gesunden gibt Abb.15 wieder.

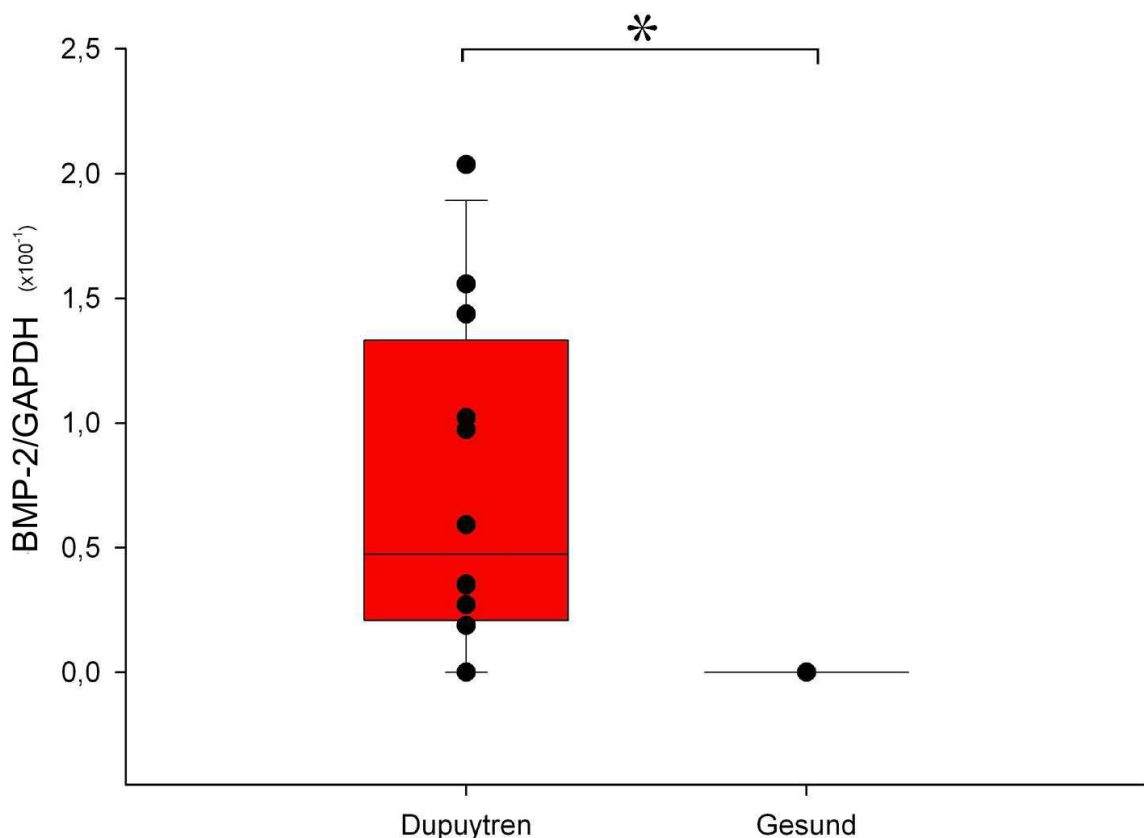


Abb. 15 Höhe der **BMP-2** Expression im Dupuytrogewebe (n=12) im Vergleich zum Gesunden (n=4),

* bedeutet signifikant auf dem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

(p-Wert=0,018, Mann-Whitney rank sum test)

Hierbei zeigte sich eine deutliche Expression ($p=0,018$, Mann-Whitney rank sum test) im Dupuytrogewebe, wohingegen im Gesunden keine Expression nachweisbar war. Allerdings gab es eine große Streuung der Werte innerhalb der Dupuytren-Gewebe-proben. Der Wertebereich lag bei 0,0 – 2,1, bei einem arithmetischen Mittel von 0,73 und einer Standardabweichung von 0,67. Eine selektive Betrachtung der einzelnen Stadien dieser Proben schien daher sinnvoll.

Abb.16 zeigt die BMP-2 Expressionen in den einzelnen Stadien des Dupuytren-Gewebes. Eine erhöhte Expression fand sich in den ersten 3 Stadien (P, P-I und I). Dagegen war das Expressionslevel im Residualstadium im Vergleich zu den hyperzellulären Stadien signifikant ($p \leq 0,05$) geringer und befand sich nahezu auf dem Niveau gesunden Gewebes.

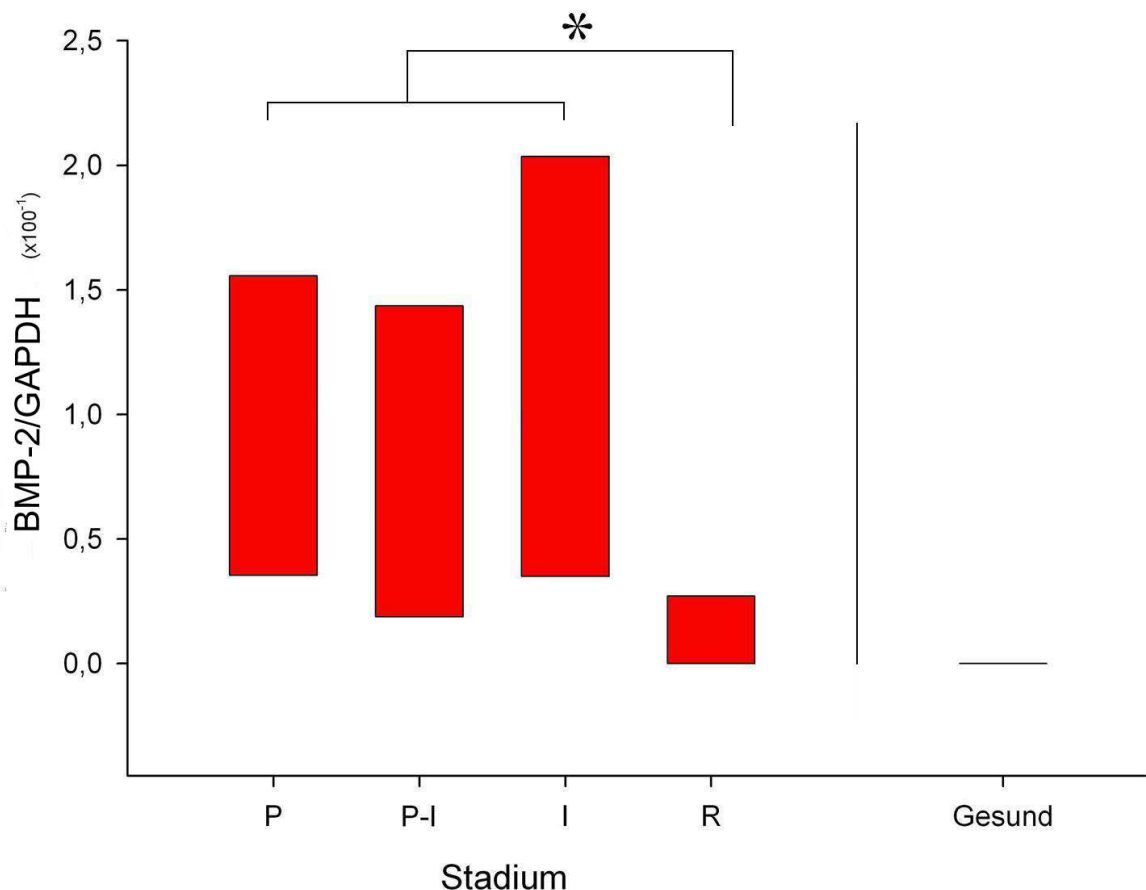


Abb. 16 Höhe der **BMP-2** Expression in den einzelnen Stadien des Dupuytren-Gewebes ($n(P)=3$, $n(P-I)=3$, $n(I)=3$, $n(R)=3$), * bedeutet signifikant auf dem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$,
(p -Wert=0,026, Mann-Whitney rank sum test)

BMP-7

Die Expressionshöhe von BMP-7 zeigte im Dupuytrogewebe keine Unterschiede zum gesunden Gewebe (Abb.17). Sie war sowohl im erkrankten als auch im gesunden Gewebe in etwa gleicher Höhe vorhanden.

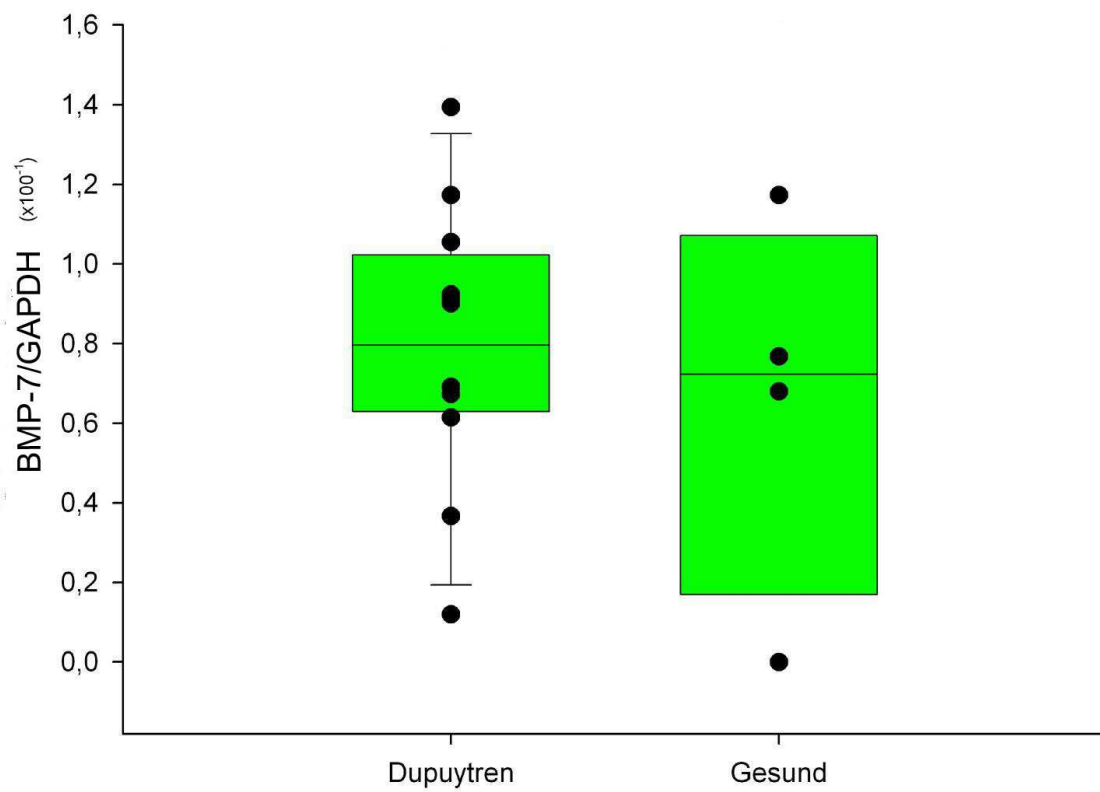


Abb. 17 Höhe der **BMP-7** Expression im Dupuytrentewebe (n=12) im Vergleich zum Gesunden (n=4)

(p-Wert= 0,76, Mann-Whitney rank sum test)

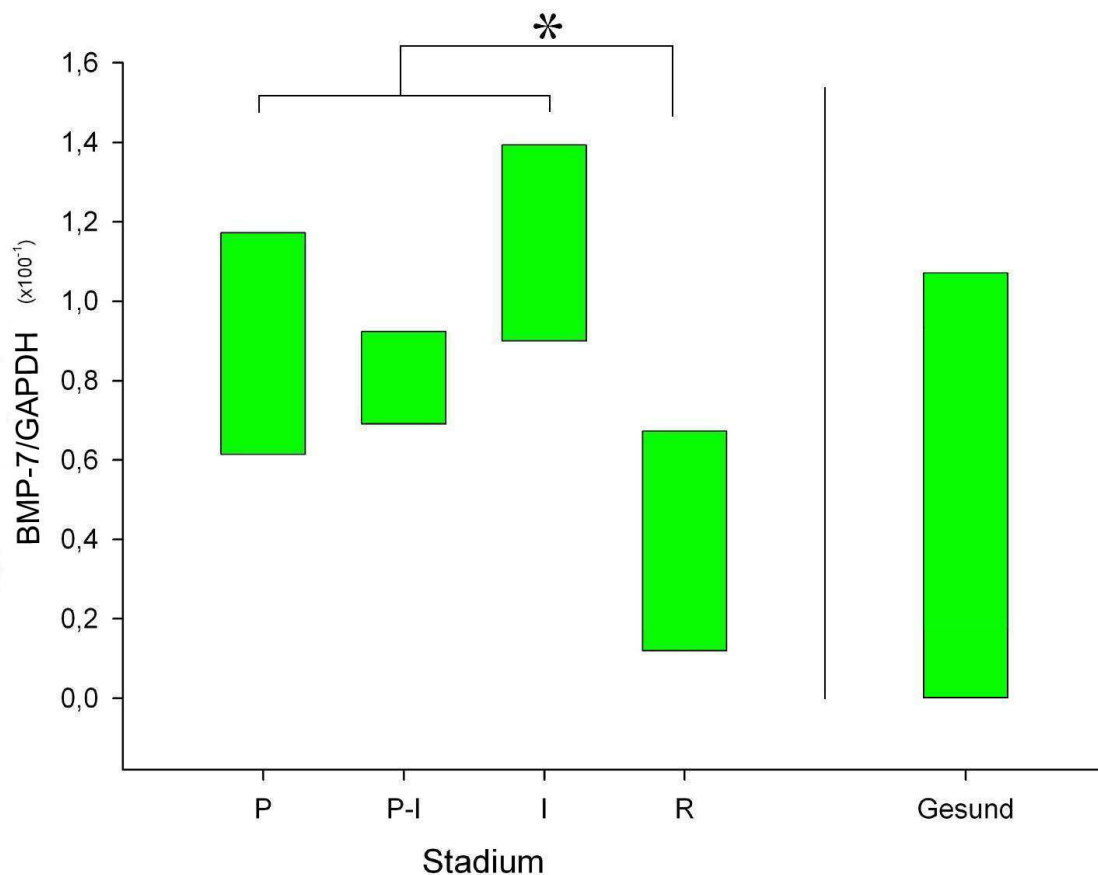


Abb. 18 Höhe der **BMP-7** Expression in den einzelnen Stadien des Dupuytren-Gewebes, * bedeutet signifikant auf dem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$,

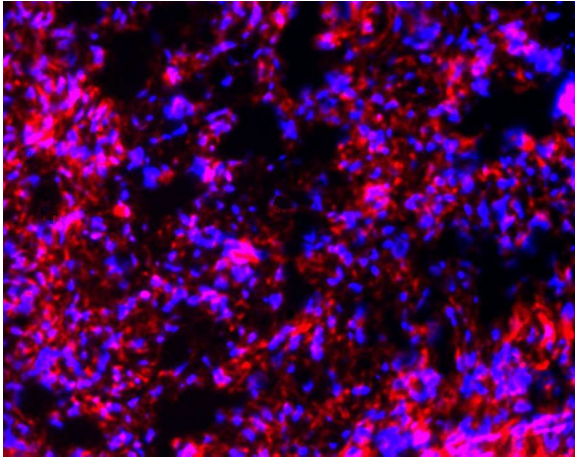
(p-Wert= 0,027, Mann-Whitney rank sum test)

Die stadienabhängige Betrachtung zeigte allerdings ähnliche Verhältnisse wie bei der BMP-2 Expression: In den Stadien P, P-I und I wurde BMP-7 verstärkt exprimiert. Im Residualstadium war die Expression im Vergleich zu den hyperzellulären Stadien signifikant ($p \leq 0,05$) vermindert ($p \leq 0,027$, Mann-Whitney rank sum test). Im Vergleich zum gesunden Gewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

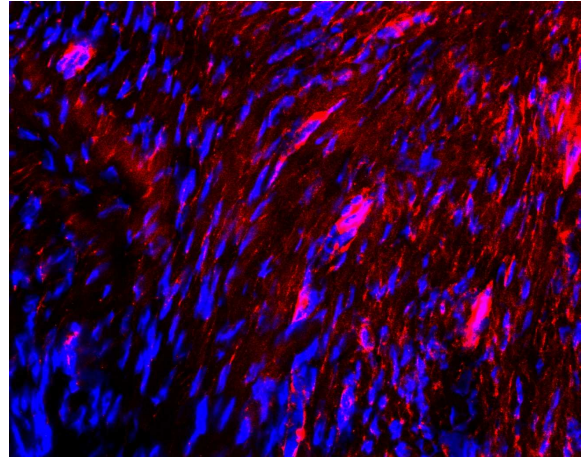
6.3. Immunhistologie

Zum Nachweis der BMP-Moleküle und deren Lokalisation im Gewebe wurde eine immunhistologische Einzelmarkierung durchgeführt. Antikörper gegen BMP-2 und BMP-7 wurden jeweils mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (AlexaFluor 594©) markiert. Zellkerne wurden mit dem blauen DNA-Farbstoff (DAPI©) gegengefärbt.

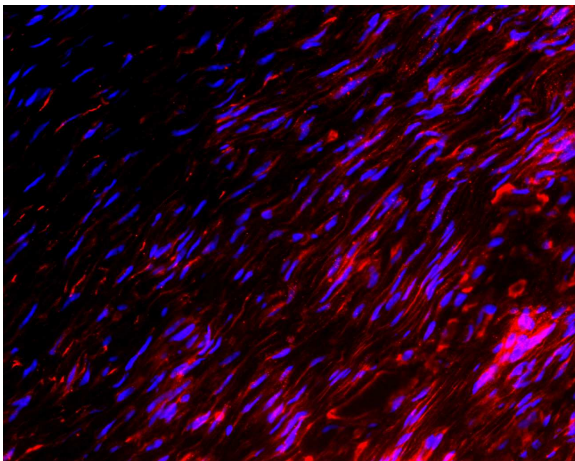
Regionen erhöhter Zelldichte färbten sich daher blau an. Abb. 19 zeigt, dass BMP-2 in den Gewebsschnitten nachweisbar ist. Eine besonders deutliche Anreicherung BMP-2 positiver Areale zeigte sich in Regionen erhöhter Zelldichte. So war der Großteil der Zellen im Proliferations- sowie Involutionsstadium BMP-2-positiv, wohingegen sich im Residualstadium lediglich Zellen um Gefäße und vereinzelt Fibroblasten anfärbten.



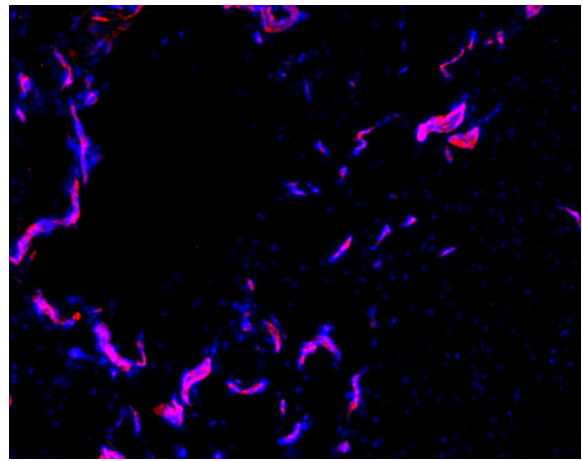
Proliferationsstadium (P), Objektivvergrößerung:
20fach



Übergangsstadium (P-I), Objektivvergrößerung:
20fach



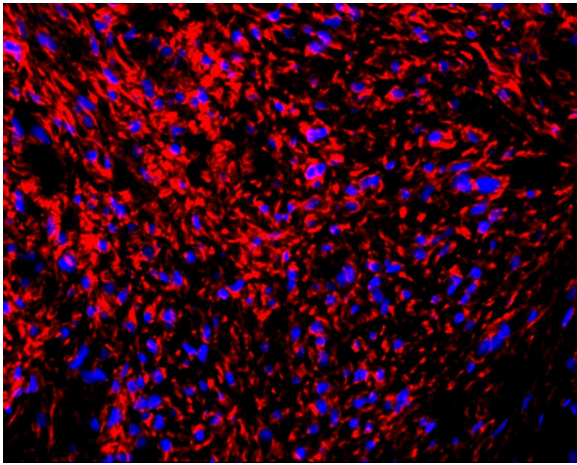
Involutionsstadium (I), Objektivvergrößerung:
20fach



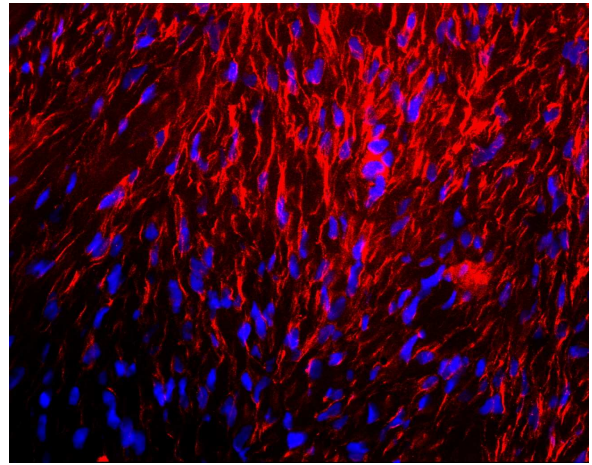
Residualstadium (R), Objektivvergrößerung:
10fach

Abb. 19 Darstellung von **BMP-2** in den einzelnen Stadien des Dupuytren-Gewebes

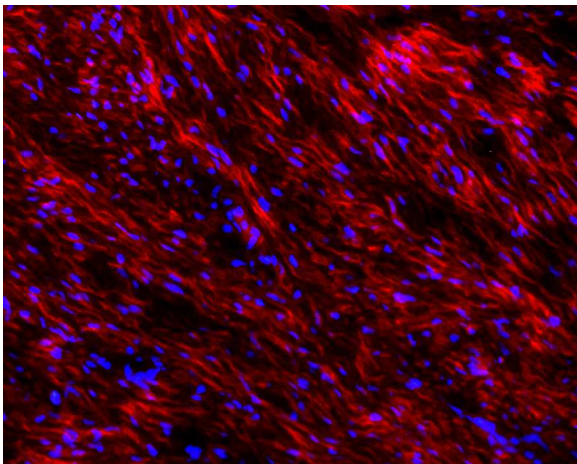
Areale mit BMP-7-positiven Zellen fanden sich, wie in Abb. 20 gezeigt, ebenfalls im Proliferations- und Involutionsstadium. Auch hier fanden sich im Residualstadium nur in der Umgebung von Gefäßen BMP-7-positive Zellen.



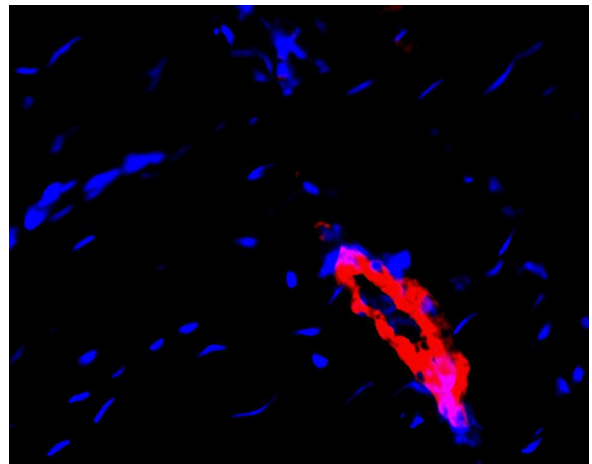
Proliferationsstadium (P), Objektivvergrößerung: 20fach



Übergangsstadium (P-I), Objektivvergrößerung: 20fach



Involutionsstadium (I), Objektivvergrößerung: 20fach



Residualstadium (R), Objektivvergrößerung: 20fach

Abb. 20 Darstellung von **BMP-7** in den einzelnen Stadien des Dupuytren-Gewebes

In gesundem Gewebe (Abb. 21-22) fanden sich BMP-2- und BMP-7-positive Zellen lediglich in der Umgebung von Gefäßen.

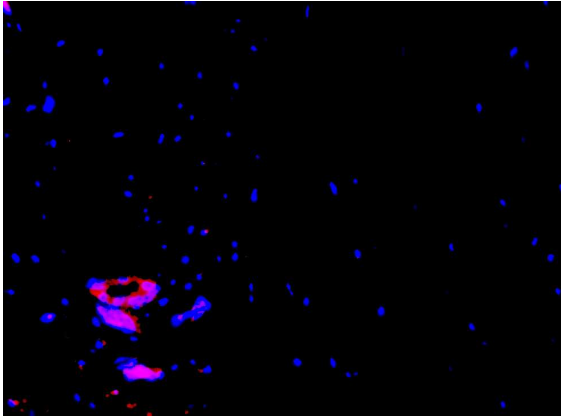


Abb. 21 BMP-2 in gesundem Gewebe, Akkumulation nur um Gefäße, Objektivvergrößerung: 10fach

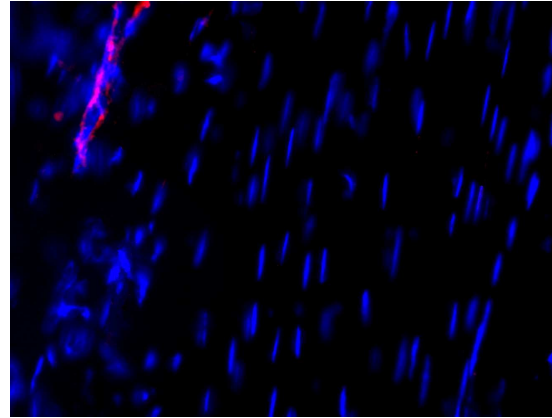
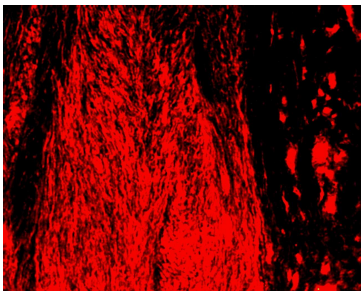
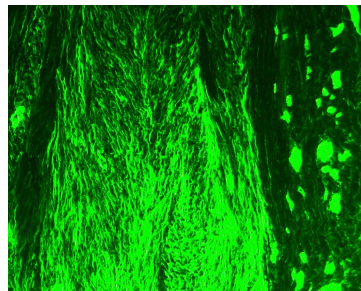


Abb. 22 BMP-7 in gesundem Gewebe, Akkumulation nur um Gefäße (Längsschnitt: links oben, Objektivvergrößerung: 20fach

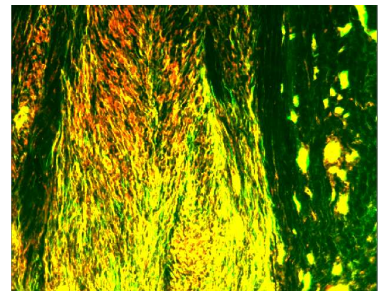
Die Doppelmarkierung mit α -SMA Antikörpern zeigte eine Ko-lokalisierung von α -SMA-positiven Zellen (Myofibroblasten und glattmuskuläre Zellen der Gefäße) mit sowohl BMP-2 als auch BMP-7. Grün dargestellt ist hier α -SMA und rot wiederum BMP. In den hyperzellulären Stadien waren sowohl Myofibroblasten als auch Gefäße doppelt positiv. Im Residualstadium hingegen waren Ko-Lokalisationen lediglich um Gefäße zu finden.



BMP-2



α -SMA



Doppelmarkierung: α -SMA/BMP-2

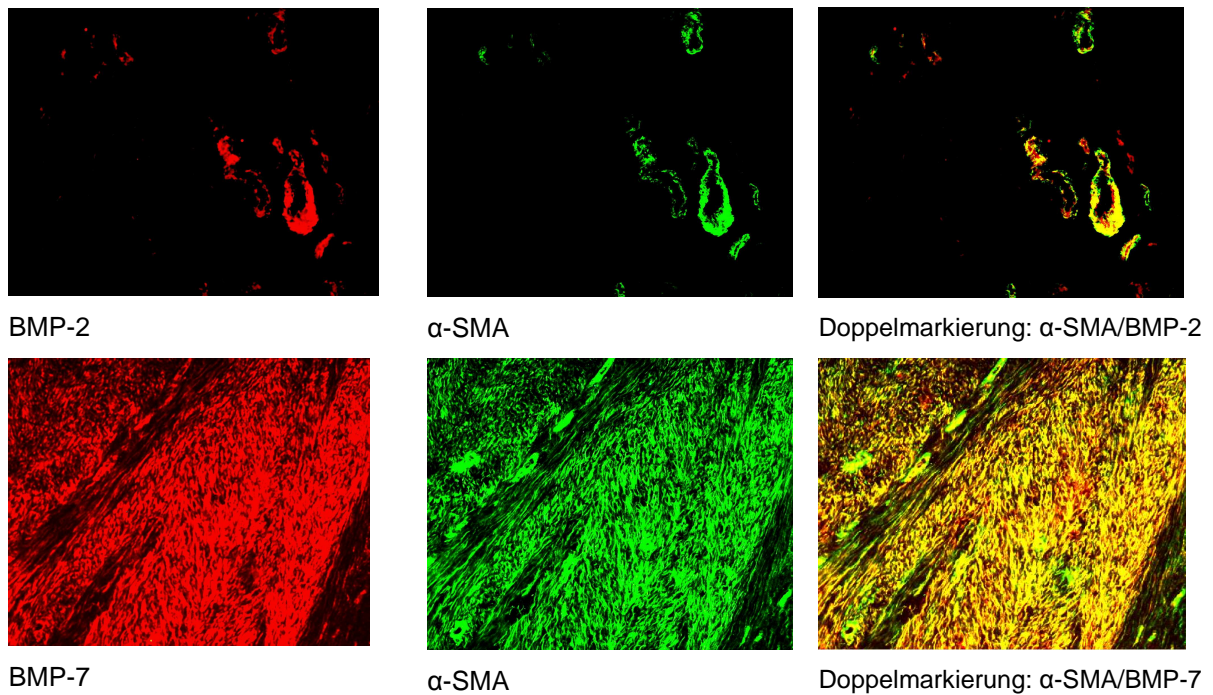


Abb. 23 Gegenüberstellung der Einzel- und Doppelmarkierungen, in der Doppelmarkierung sind gelb erscheinende Areale doppelt positiv und zeigen Ko-Lokalisation von α -SMA positiven Zellen (Myofibroblasten und Gefäße) und BMP. Die obere und untere Reihe zeigen Markierungen im Proliferationsstadium, in dem der Großteil der Zellen doppelt positiv reagiert, die mittlere Reihe zeigt das Residualstadium, in welchem nur noch Gefäße eine doppelte Reaktivität zeigen, (Objektivvergrößerung: 10fach)

Antikörper-Isotypenkontrollen zeigten einheitlich keine positiven Reaktionen. Die Einzelmarkierungen wiesen vergleichbare Reaktionen wie in der BMP/ α -SMA Doppelmarkierung auf (nicht abgebildet).

6.4. Zellkultur

6.4.1. Zelltypenbestimmung

Nach 17 Tagen Kultivierung wurden sämtliche Kulturen mit einem Phasen-Kontrast-Mikroskop (Axiovert®, Zeiss™) betrachtet. Hierbei wurden lediglich Fibroblasten gefunden. Jede Kultur der einzelnen Gewebstückchen setzte sich - relativ homogen - aus Fibroblasten eines Zelltyps zusammen, von denen 3 Typen unterschieden werden konnten.

Zelltyp	Eigenschaften
F I	<ul style="list-style-type: none">• schlanke, spindelförmige Zellen• klare Anordnung
F II	<ul style="list-style-type: none">• breite Zellen• erkennbare Anordnung
F III	<ul style="list-style-type: none">• breite Zellen• diffuse Anordnung• unregelmäßiges Erscheinungsbild

Abb. 24-26 zeigen die Bilder der Phasen-Kontrast-Mikroskopie.

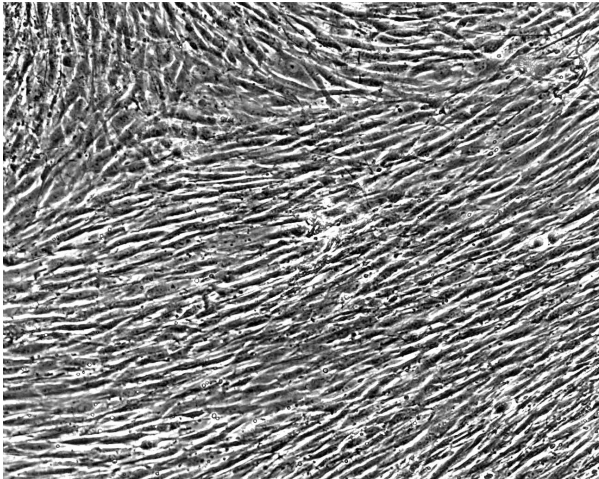


Abb. 24 Phasenkontrast-Mikroskopie von **F I** - Kulturen mit schlanken, spindelförmigen Zellen in klarer Anordnung, Objektivvergrößerung: 10fach

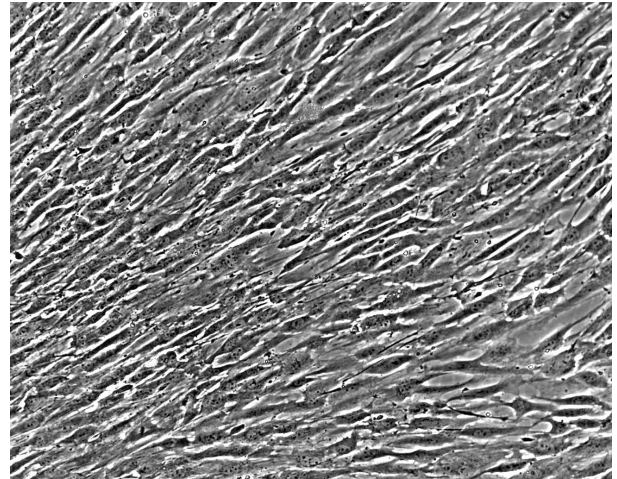


Abb. 25 Phasenkontrast-Mikroskopie von **F II** - Kulturen mit breiteren Zellen in erkennbarer Ordnung, Objektivvergrößerung: 10fach

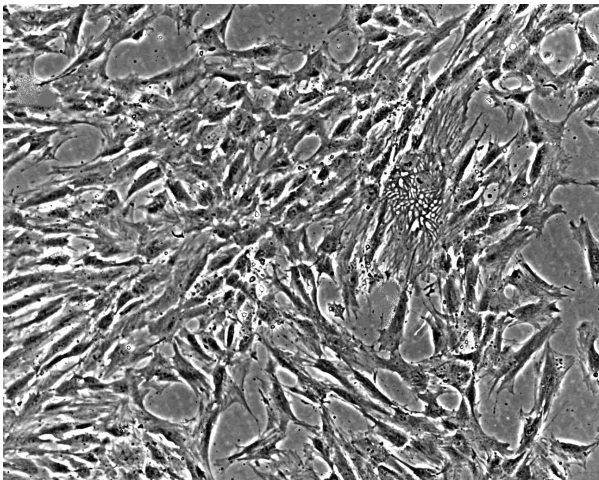


Abb. 26 Phasenkontrast-Mikroskopie von **F III** - Kulturen, breitere Zellen mit z.T. Zellausläufern in diffuser Ordnung, Objektivvergrößerung: 10fach

Es fanden sich 6 Kulturen mit F I Zellen, 3 mit F II und 5 mit F III Zellen.

6.4.2. Polymerase-Kettenreaktion

Da sämtliche Kulturen homogen aus nur einem Zelltypen bestanden, konnten diese zusammen molekularbiologisch untersucht werden. So wurden von F I, F II und F III

jeweils eine PCR von BMP-2, BMP-7 und GAPDH angefertigt. Abb. 27 und 28 zeigen die SQ von BMP-2 und BMP-7 der einzelnen Zelltypen, normalisiert auf GAPDH.

BMP-2

Es war in allen Kulturen keine mRNA für BMP-2 nachweisbar (Abb. 27).

BMP-7

Die Expression von BMP-7 unterschied sich in den einzelnen Zelltypen. So war die Expression in F II-Zellen etwa 3fach so hoch wie in F I. F III hingegen zeigte eine fast 63fache (62,58) Expressionshöhe gegenüber der F I-Zellen.

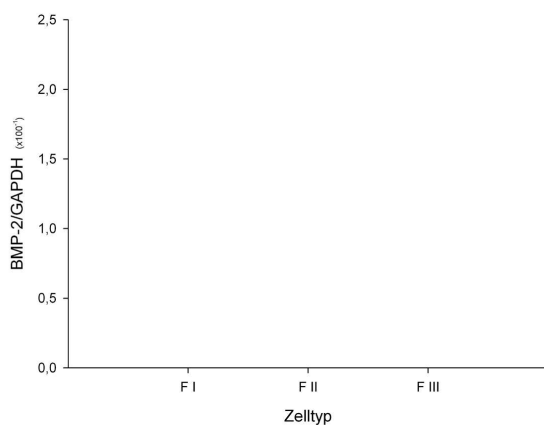


Abb. 27 keine **BMP-2** Expression in allen Zelltypen aus der Zellkultur

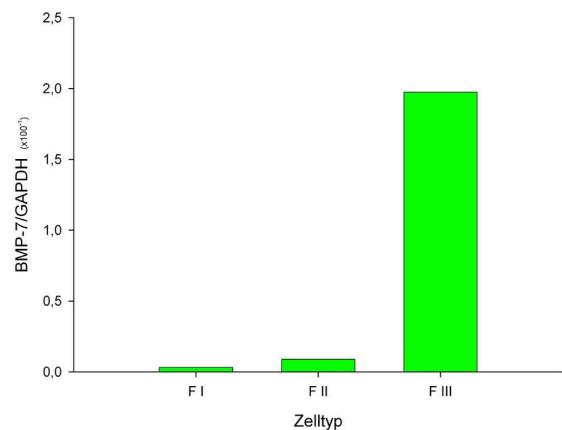


Abb. 28 **BMP-7** Expression der einzelnen Zelltypen aus der Zellkultur

7. Diskussion

Der Morbus Dupuytren ist eine fibroproliferative Erkrankung der Palmaraponeurose. Obwohl bereits verschiedenste Faktoren untersucht und in Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht wurden, ist die eigentliche Pathogenese des M. Dupuytren nach wie vor weitgehend unverstanden. So ist auch eine Reihe verschiedenster Wachstumsfaktoren immer wieder ins Zentrum des Interesses gerückt und untersucht worden. Im Speziellen sind Zytokine wie bFGF, TGF- β , EGF, PDGF untersucht und ein Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und der Erkrankung festgestellt worden (Badalamente und Hurst 1999). Des Weiteren wurde auch in einer Arbeit von Shin und Mitarbeitern (Shin et al. 2004) eine Reihe von BMP's im Zusammenhang mit Morbus Dupuytren untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von bestimmten BMPs durch Fibroblasten aus Dupuytregewebe im Vergleich zum Gesunden in Kultur vermindert ist. BMPs stellen die größte Gruppe der TGF-Superfamilie dar. Ihre Rolle in Proliferation und Zelldifferenzierung ist in vielen Organsystemen intensiv untersucht worden und ihre Beteiligung an fibrotischen Veränderungen in verschiedenen Organsystemen wie Lunge, Leber, Niere und auch hypertrophe Narbenbildung beschrieben (Branton 1999, Kopp et al. 2006). Zwei wichtige Vertreter dieser Gruppe sind BMP-2 und BMP-7. Der Zusammenhang zwischen diesen BMPs und einer fibroproliferativen Erkrankung wie dem Morbus Dupuytren lag daher nahe. Dieser Zusammenhang sowie die Ergebnisse in vitro, der bereits vorhandenen Arbeit von Shin et al. gaben Anlass zur Anfertigung dieser Studie, die die Verhältnisse in vivo untersuchen sollte.

Da die histologischen Stadien nach Luck (Luck 1959) in gewisser Weise eine Korrelation zur Erkrankungsaktivität darstellen, schien uns daher eine Betrachtung der Expression in Abhängigkeit dieser Stadien sinnvoll.

7.1. Histologische Stadieneinteilung

Die Einteilung der Stadien erfolgte entsprechend der Einteilung nach Luck in Proliferations-, Involutions- und Residualstadium (Luck 1959). Diese wird auch von den meisten Autoren verwendet, die sich mit Wachstumsfaktoren im histologischen Kontext auseinandersetzen (Badalamente 1992, Badalamente 1996, Berndt et al.

1995) und auch die Ergebnisse dieser Arbeit rechtfertigen eine solche Einteilung. Eine weitere - makroskopische - Einteilung des Gewebes in Knoten- und Strangstadium (Vande Berg et al. 1984, Bisson et al. 2003) ist - unserer Erfahrung nach - für histologische Studien nicht zu empfehlen, da eine Differenzierung zwischen Knoten und Strang nicht immer möglich ist (Abb. 29).

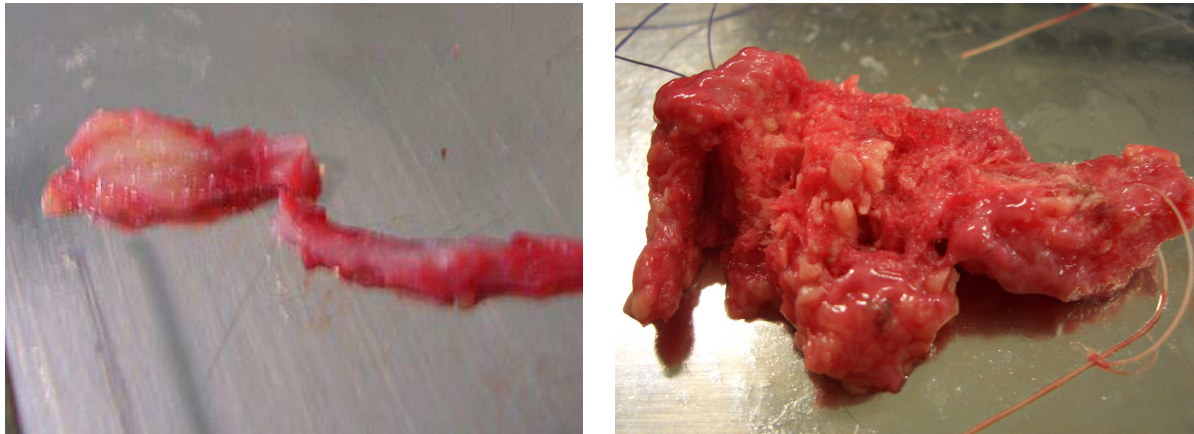


Abb. 29 Resektionspräparate des Morbus Dupuytren, im linken Bild ist eine deutliche Unterscheidung zwischen Knoten und Strang möglich, im rechten jedoch nicht

Außerdem zeigte sich - selbst bei sauberer Differenzierung - kein Zusammenhang zu den histologischen Stadien nach Luck. Die histologische Untersuchung von 16 präparierten, deutlich erkennbaren Knoten ergab: 7mal Proliferationsstadium, 4mal Involutionsstadium, 2mal Residualstadium und sogar 3mal histologisch gesund erscheinendes Gewebe. Obwohl Unterschiede in Zellen aus der Knoten-Region zu denen aus der Strangregion bezüglich α -SMA-Expression bestehen (Badalamente 1983, Vande Berg et al. 1984, Bisson et al. 2003), die auf eine mögliche Bedeutung dieser Einteilung hinweisen, liegen doch auch gegensätzliche Ergebnisse in Bezug auf die metabolische Aktivität der Zellen und den Anteil der Myofibroblasten an der Gesamtzahl der Zellen aus den Regionen vor (Brickley-Parsons et al. 1981, Weber et al. 1986, Seyhan et al. 2006).

Um die histologischen Verhältnisse im molekularbiologisch untersuchten Gewebe zu bestimmen, wählten wir eine bislang nicht etablierte Methode: Ein repräsentatives Stück Gewebe war in zwei möglichst gleiche Teile zerschnitten worden. Eines wurde histologisch untersucht und das andere für die RNA-Isolation verwendet, sobald ein Stadium deutlich ausgeprägt war. Wir wählten dafür einen Schwellenwert von >50%,

d.h. über die Hälfte des Gewebes musste Merkmale des bestimmten Stadiums aufweisen. Das sollte sicherstellen, dass Unterschiede auch wirklich auf das Stadium zurückzuführen sind. Es gibt hierzu keine vergleichbare Untersuchung in der Literatur. Der Schwellenwert ist daher als experimentell und nicht gesichert (bestätigt) anzusehen. Nichtsdestoweniger rechtfertigen die in der PCR festgestellten Unterschiede (siehe 6.2. PCR) ein solches Vorgehen.

7.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Expression von BMPs ist bereits an Dupuytrenzelllinien analysiert worden. Shin und Mitarbeiter (Shin et al. 2004) verglichen Fibroblasten aus Dupuytrogewebe mit denen aus normaler Palmaraponeurose und konnten eine verminderte Expression von BMP-6, -8, -11 in Fibroblastenkulturen aus Dupuytrogewebe im Vergleich zu solchen aus Normalgewebe feststellen. Keinerlei Expression fanden sie hingegen für BMP-2, -3, -5, -7, -9 und -10. BMP-4 zeigte eine deutliche Expression in Fibroblasten aus Normalgewebe, jedoch keine bei solchen aus Dupuytrogewebe. Aufgrund der Tatsache, dass Zellkulturen in vitro Modelle darstellen und damit die natürliche Wirklichkeit - gegebenenmaßen - nur in bestimmtem Maß widerspiegeln, wurde mit der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, mit der Verwendung von Nativgewebe, die Verhältnisse in vivo zu untersuchen. Ganz im Gegensatz zur Arbeit von Shin et al., die ausschließlich Fibroblastenkulturen untersuchten, fanden wir im Nativgewebe eine deutliche Expression von BMP-7, sowohl im Dupuytrogewebe als auch im Gesunden. Hingegen zeigte sich eine Expression von BMP-2 nur im Dupuytrogewebe, nicht jedoch im Gesunden. Für die Entstehung und den Progress der Erkrankung könnte BMP-2 daher eine Rolle spielen. Welche Faktoren zu dieser Überexpression führen und was letztlich die zelluläre Wirkung dieses Zytokins ist, muss weiterer Forschung vorbehalten bleiben. Eine konstitutive BMP-2 Expression wurde für glatte Muskelzellen und auch Endothelzellen aus größeren Blutgefäßen beschrieben (Willette et al. 1999). Dass im gesunden Gewebe keine Expression detektiert werden konnte, könnte an der extremen Hypovaskularität der Palmaraponeurose liegen. Diese macht wahrscheinlich, dass sich kein größeres Gefäß im Untersuchungsmaterial befand. Die positive Reaktion auf BMP-2 in der Immunfluoreszenz in kleineren Gefäßen und Kapillaren, könnte mit einer ektopen Bildung von BMP-2 erklärt werden. Oder die Synthese der wenigen Gefäßzellen

macht es wahrscheinlich, dass diese in der PCR nicht detektiert werden konnte. Gründe für die Unterschiede zwischen Zellkultur und Nativgewebe werden im Kapitel 7.4 „Zellkultur“ erörtert.

Innerhalb der untersuchten Gruppe des erkrankten Gewebes zeigten sich Unterschiede im Expressionsmuster: Im Residualstadium war eine deutlich verminderte Expression von sowohl BMP-2 als auch von BMP-7 im Vergleich zu den hyperzellulären Stadien wie Proliferation- und Involutionsstadium zu finden. Dass BMP-7 im gesunden und erkrankten Gewebe in etwa gleicher Höhe exprimiert wird, macht eine ursächliche Beteiligung an der Auslösung des Krankheitsprozesses unwahrscheinlich. Jedoch ist eine Reduktion der BMP-7 Expression, wie sie im Residualstadium zu finden ist, auch in geschädigtem Nierengewebe, das in einer Fibrose gipfelt, nachzuweisen (Zeisberg et al. 2005). Für TGF- β ist eine erhöhte Expression im Morbus Dupuytren beschrieben und seine Fähigkeit der Induktion einer Phänotypenkonversion von Fibroblasten zur aktivierten Form - den Myofibroblasten - mehrfach nachgewiesen (Desmoulière et al. 1993, Badalamente und Hurst 1999, Hindman et al. 2003). Wie in Leber und Niere gezeigt, kann BMP-7 die fibrogene Wirkung von TGF- β zumindest teilweise antagonisieren und damit einen fibrotischen Umbau der Organe verhindern. In Zellen geschädigter Nieren ist die Expression von BMP-7 im Vergleich zu gesunder - wie hier für das Residualstadium des Morbus Dupuytren nachgewiesen - vermindert. Hier konnte sogar im Tiermodell durch die systemische Gabe von BMP-7 die Restitution zu normalen Nierengewebe und damit der Heilungsprozess beschleunigt werden (Zeisberg et al. 2005). In der kranken Leber wird BMP-7 stärker exprimiert als in gesunder (Tacke et al. 2007). Dennoch konnte im Tiermodell auch hier die fibrogene Wirkung von TGF- β durch Zugabe von BMP-7 attenuiert werden (Sugimoto et al. 2007). Unterschiedliche BMP-Rezeptorenausstattung verschiedener Zellen und weitere Faktoren, die die Bindungsaffinität zum Rezeptor beeinflussen, sowie Inhibitoren und Ko-Aktivatoren sind beschrieben und tragen zur Komplexität der BMP-Wirkung in vivo bei (Zeisberg 2003, Lin 2005, Tacke et al. 2007). Ob - wie in der Leber - ein Ungleichgewicht zwischen TGF- β und BMP-7 auch für den M. Dupuytren eine Rolle spielt, müssen weitere Studien zeigen. Auch konnte im Tiermodell durch BMP-7 eine Stimulierung der Leberzellregeneration ausgelöst werden (Sugimoto et al. 2007). Inwieweit die Gabe von rekombinantem BMP-7 eine

kurativ-therapeutische oder zumindest palliative Option in der Behandlung des Morbus Dupuytren darstellt, wäre ein interessantes Feld zukünftiger Forschung. Bei der Methode, wie sie in dieser Studie angewandt wurde, sind sämtliche im Gewebe vorkommenden Zellen, also auch Zellen aus Blutgefäßen, Nerven, etc., mit untersucht worden. Eine verminderte BMP-7 Expression im hypovaskulären Residualstadium kann daher an einer geringeren Dichte an glatten Muskelzellen der Gefäße liegen, die ihrerseits BMP-7 exprimieren und auch immunhistologisch BMP-7 aufweisen. Möglicherweise ist aber die verminderte Expression im Residualstadium auch als ein Epiphänomen während einer allgemeinen Umstellung der zellulären Aktivität in diesem Stadium zu werten. Darüber hinaus muss aufgrund der relativ geringen Probenzahlen, trotz theoretischer Signifikanz, an ein statistisches Phänomen gedacht werden. Da die tatsächlich untersuchten Stadien nur durch die histologische Untersuchung des ähnlichen Gewebes eingeschätzt werden konnten und selbst dann lediglich 50% des Gewebes dieses Stadium auch aufweisen musste, liegen hierfür weitere Quellen für mögliche Fehlinterpretationen. Dennoch stellt die Methode einen einfachen und dennoch relativ zuverlässigen Weg dar, sich den molekularbiologischen Verhältnissen auf histologischer Ebene zu nähern. Eine klarere Einordnung in das entsprechende Stadium (weit größer als 50%) könnte durch die Verwendung kleinerer Proben erzielt werden.

7.3. Immunhistologie

Die Verteilung der BMP-Moleküle im erkrankten Gewebe wurde durch die Immunhistologie gezeigt. Um eine krankheitsspezifische - eventuell sogar ursächliche - Bedeutung dieser Wachstumsfaktoren zu erforschen, lag der Vergleich zu gesundem Gewebe, aber auch die Betrachtung der einzelnen Erkrankungsstadien, nahe. Zum Zeitpunkt lagen Arbeiten vor, die sich bereits mit der Verteilung von Wachstumsfaktoren im Dupuytren-Gewebe, wie TGF- $\beta_{1,2,3}$, PDGF und bFGF, beschäftigten (Badalamente 1992, Berndt et al. 1995, Badalamente 1996). Diese nutzten ebenfalls diese Herangehensweise. In den hyperzellulären Stadien, wie Proliferations- und Involutionsstadium, konnten alle untersuchten Wachstumsfaktoren detektiert werden. Jedoch zeigten bFGF, PDGF und TGF- β_3 im hypozellulären Residualstadium nur noch vereinzelt eine und zudem deutlich schwächere positive Reaktion, während TGF- β_2 gar nicht mehr nachweisbar war.

TGF- β_1 ist sowohl in sämtlichen Stadien des erkrankten Gewebes als auch im Gesunden nachweisbar. Darüber hinaus zeigen Endothelzellen von Blutgefäßen eine positive Reaktion auf all diese Wachstumsfaktoren, auch in Stadien in denen Fibroblasten und Myofibroblasten keine Reaktion aufweisen (Badalamente 1992, Badalamente 1996, Berndt et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Primärantikörper von R&D Systems (MAB355) verwendet, der nicht spezifisch für BMP-2 ist, sondern auch BMP-4 als Epitop erkennt. Zum Zeitpunkt der Ausführung der Arbeit war kein BMP-2-spezifischer Antikörper verfügbar, sodass eine Reaktion als BMP-2/4-positiv zu werten ist. Der Nachweis der BMP-2-spezifischen mRNA in der PCR macht aber das Vorkommen von BMP-2 auch histologisch wahrscheinlich. Der verwendete Antikörper gegen BMP-7 (R&D Systems© MAB3541) reagiert dagegen spezifisch.

Es konnte gezeigt werden, dass Zellen im Proliferations- und Involutionsstadium sowohl BMP-2 als auch BMP-7 deutlich positive Reaktionen zeigen. Im Residualstadium färben sich lediglich Blutgefäße und vereinzelte Fibroblasten an. Im gesunden Gewebe sind nur Blutgefäße BMP-positiv.

In der Pathogenese des Morbus Dupuytren spielt die Aktivierung von Fibroblasten eine entscheidende Rolle. Dabei findet eine Umwandlung dieser in Myofibroblasten statt, was als Phänotypenkonversion bezeichnet wird. Diese Myofibroblasten stellen die metabolisch aktive, proliferierende Zellart und den Großteil der vorkommenden Zellen in den hyperzellulären Stadien des erkrankten Gewebes dar. Ein Indikator dieser Transdifferenzierung stellt der Zytoskelettbaustein α -SMA dar, der eine Unterscheidung zwischen Myofibroblasten und den - zytomorphologisch sehr ähnlichen - Fibroblasten erlaubt. Eine Korrelation zwischen Myofibroblasten (α -SMA-positiven Zellen) und dem Vorkommen von Wachstumsfaktoren wurde für TGF- $\beta_{1,2}$ und PDGF untersucht und konnte für TGF- β_2 und PDGF nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Ko-lokalisation von beiden untersuchten BMPs und Myofibroblasten gezeigt werden. Um Myofibroblasten auch als Synthese- oder Effektorzellart zu charakterisieren, müsste eine in-situ Hybridisierung der BMP-mRNA bzw. eine Markierung der BMP-Rezeptoren erfolgen.

Da der Zytoskelettbaustein α -SMA allerdings eigentlicher Bestandteil von glatten Muskelzellen ist, wie sie auch in Blutgefäßwänden vorkommen, färben sich diese ebenfalls an. Eine Ko-lokalisation konnte daher auch für beide untersuchte BMPs und Blutgefäßen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind mit denen der PCR zu vereinen. Eine erhöhte Expression in den hyperzellulären Stadien fand sich auch in einer deutlich positiven Reaktion in der Immunfluoreszenz wieder. Ebenso zeigt sich die verminderte Expression beider untersuchter BMPs im Residualstadium mit einer geringen, sich z.T. nur auf die Gefäße beschränkende, Reaktion in der Histologie. Allein die fehlende Expression von BMP-2 im gesunden Gewebe bei positivem Nachweis um Gefäße lässt sich so nicht vereinbaren. Hierfür könnte eine ektope Synthese des BMP-2 verantwortlich sein, oder ein methodisches Problem: Aufgrund der geringen Größe des gesunden Untersuchungsmaterials konnten keine zwei korrespondierenden Gewebestücke gewonnen werden, um eine vergleichende Untersuchung anzufertigen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um interindividuelle Unterschiede in der BMP-2-Expression im Gesunden handelt.

7.4. Zellkultur

Eine Arbeit von Shin und Mitarbeitern (Shin et al. 2004) untersuchte die Expression von BMP-1 bis BMP-11 an Kulturen von Fibroblasten aus Dupuytrenngewebe und aus normaler Aponeurose. Aufgrund des von uns festgestellten davon abweichenden Expressionsmusters im Nativgewebe und der daraufhin erwachsenen Frage, inwieweit eine Kultivierung der Zellen ihr Expressionsverhalten verändert, untersuchten wir unsere eigens kultivierten Zellen.

Mikroskopisch differenzierten wir drei verschiedene Zelltypen, wohingegen anderen Arbeiten lediglich eine Zellart: „Fibroblasten aus Dupuytrenngewebe“ zu Grunde legen. Diese drei Zelltypen zeigen alle eine unterschiedliche Expression von BMP-7. Eine Untersuchung von Nativgewebe beinhaltet immer nicht nur Fibroblasten resp. Myofibroblasten sondern auch andere dort vorkommende Zellen, wie glatte Muskelzellen, Nervenzellen etc.. Bei der Interpretation von PCR-Daten sollte daher nicht nur beachtet werden, dass die Vaskularisation eine Rolle spielt, sondern auch, dass verschiedene Fibroblastentypen zu einer bestimmten gemessenen Expression beitragen.

Dass eine BMP-2 Expression in kultivierten Fibroblasten nicht nachweisbar ist, hingegen in Nativgewebe schon, zeigt abermals, dass die Kultivierung von Fibroblasten einen Einfluss auf deren Expressionsverhalten haben kann. So könnte der Mediumwechsel zu einem Auswaschen und damit zu einer verminderten

Konzentration von Faktoren führen, die die Expression beeinflussen. Darüber hinaus konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass auch Kultivierungsbedingungen Einfluss auf die Fibroblasten Phänotypen haben. So wurden in einer Fibroblastenkultur mit geringer Zelldichte nach 5-7 Tagen bis zu 80% Myofibroblasten gefunden, während in einer mit hoher Zelldichte der Myofibroblastenanteil lediglich 10% betrug (Masur 1996). Da Myofibroblasten eine andere metabolische Aktivität und ein anderes Expressionsprofil als Fibroblasten haben (Tomasek et al. 1999, Kloen 1999), kann das zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Eine Bestimmung der Expression von α -SMA und damit die Charakterisierung als Myofibroblast unserer kultivierten Zellen hätte eine weitere Interpretation der Ergebnisse erlaubt.

Dieser Versuch ist einmal durchgeführt worden, um einen Anknüpfungspunkt zur Arbeit von Shin et al. herzustellen. Um statistisch sichere Ergebnisse zu erlangen, müsste er mehrfach wiederholt werden. Obwohl dieser Versuch bereits bemerkenswerte Unterschiede aufgedeckt hat, trägt er dennoch nur Vorversuchscharakter.

8. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hat Expression und Vorkommen von BMP-2 und BMP-7 im Morbus Dupuytren untersucht. Beide untersuchten BMPs sind in der vorliegenden Arbeit erstmalig im Gewebe des Morbus Dupuytren und damit in vivo nachgewiesen worden. Die mit der bisherigen Literatur übereinstimmende Ko-lokalisierung von vielen, bereits untersuchten Faktoren und Myofibroblasten, stellt erneut diese Zellart, als die Entscheidende heraus. Zusätzlich lässt es auf ein komplexes Zusammenspiel all dieser Faktoren schließen und macht deutlich, dass ein monokausaler Zusammenhang zwischen einem Zytokin und der Entwicklung des Morbus Dupuytren nicht zu suchen ist.

Der positive Nachweis einer BMP-2-Expression im erkrankten Gewebe bei gleichzeitiger Abwesenheit im Gesunden macht dieses Zytokin zu einem weiteren möglichen Faktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung. Die molekularen Mechanismen seiner Wirkung und sein Beitrag zur Pathogenese müssen in folgenden Studien untersucht werden.

Die stadienabhängige Betrachtung, auch des Expressionsverhaltens, stellt eine bislang einzigartige Methode dar, sich den molekularbiologischen Verhältnissen auf histologischer Ebene zu nähern.

Die sowohl im Gesunden als auch im erkrankten Gewebe vergleichbar hohe Expression von BMP-7, jedoch der Verminderung im Residualstadium, ist z.T. mit Beobachtungen an erkranktem Nierengewebe vereinbar. Wie am Beispiel der Leber oder Niere gezeigt wurde, kann mit BMP-7 die fibrogene Wirkung von TGF- β - wie sie auch beim Morbus Dupuytren eine entscheidende Rolle spielt - gehemmt werden. Ob diese Wirkung auch im Morbus Dupuytren erzielt werden kann, muss in weiteren Studien beforscht werden, eröffnet aber prinzipiell die Möglichkeit des Einsatzes von rekombinantem BMP-7 als konservative Therapieoption.

Als unmittelbare Erkenntnis aus dem Kultivierungsversuch konnte gezogen werden, dass Zellen im Dupuytrogewebe eine histologisch heterogene Gruppe von Fibroblasten mit unterschiedlichem Expressionsmuster darstellen und diese ihre Eigenschaften in Kultur ändern, was wiederum zu einer begrenzten Aussagekraft von Zellkulturversuchen führt, die bei der Auswertung beachtet werden muss.

Der Morbus Dupuytren weist histologisch und molekularbiologisch viele Merkmale von anderen Konditionen auf und wird daher auch als Modellerkrankung für

Veränderungen wie Fibrosen von Lunge, Leber, Niere und Darm, desmoplastische Bindegewebsreaktionen bestimmter Tumoren, Narbenkeloide, aber auch physiologischer Wundheilung, verstanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen daher auch - als Grundlagenforschung - zum besseren Verständnis dieser besonderen Erkrankungen bei.

9. Literaturverzeichnis

- Alioto RJ, Rosier RN, Burton RI, Puzas JE. 1994. Comparative effects of growth factors on fibroblasts of Dupuytren's tissue and normal palmar fascia. *J Hand Surg [Am]*, 19 (3):442-452.
- Augoff K, Tabola R, Kula J, Gosk J, Rutowski R. 2005. Epidermal growth factor receptor (egf-r) in dupuytren's disease. *Journal of Hand Surgery, British & European Volume*, 30 (6):570-573.
- Badalamente MA, Hurst LC. 1999. The biochemistry of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15 (1):35-42, v-vi.
- Badalamente MA, Hurst, L.C., Grandia, S.K., Sampson, S.P. 1992. Platelet-derived growth factor in Dupuytren's disease. *J Hand Surg [Am]*, 17 (2):317-323.
- Badalamente MA, Sampson, S.P., Hurst, L.C., Dowd, A., Miyasaka, K. 1996. The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease. *J Hand Surg [Am]*, 21 (2):210-215.
- Badalamente MA, Stern, L., Hurst, L.C. 1983. The pathogenesis of Dupuytren's contracture: contractile mechanisms of the myofibroblasts. *J Hand Surg [Am]*, 8 (3):235-243.
- Baur PS, Larson DL, Stacey TR. 1975. The observation of myofibroblasts in hypertrophic scars. *Surg Gynecol Obstet*, 141 (1):22-26.
- Bengtsson L. 2007. What MAN1 does to the Smads. *TGFbeta/BMP signaling and the nuclear envelope. Febs J*, 274 (6):1374-1382.
- Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Gabler U, Luo X, Celeda D, Zardi L, Katenkamp D. 1995. TGF beta and bFGF synthesis and localization in Dupuytren's disease (nodular palmar fibromatosis) relative to cellular activity, myofibroblast phenotype and oncofetal variants of fibronectin. *Histochem J*, 27 (12):1014-1020.
- Bisson MA, McGrouther DA, Mudera V, Grobbelaar AO. 2003. The different characteristics of Dupuytren's disease fibroblasts derived from either nodule or cord: expression of alpha-smooth muscle actin and the response to stimulation by TGF-beta1. *J Hand Surg [Br]*, 28 (4):351-356.
- Branton MHK, J. B. 1999. TGF- β and fibrosis. *Microbes and Infection*, 1:1349-1365.
- Brenner P, Krause-Bergmann A, Van VH. 2001. Dupuytren contracture in North Germany, Epidemiological study of 500 cases. *Unfallchirurg*, 104 (4):303-311.
- Brickley-Parsons D, Glimcher MJ, Smith RJ, Albin R, Adams JP. 1981. Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patients with Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Am*, 63 (5):787-797.

- Brotherston TM, Balakrishnan C, Milner RH, Brown HG. 1994. Long term follow-up of dermofasciectomy for Dupuytren's contracture. *Br J Plast Surg*, 47 (6):440-443.
- Burge P. 1999. Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15:63.
- Cline HS. 1777. Notes on pathology and surgery. Manuscript, 23:185.
- Cline HS. 1787. Notes of Richard Whitfield (student) from a lecture by Henry Cline Senior. Manuscript, 30
- Colville J. 1983. Dupuytren's contracture - the role of fasciotomy. *Hand*, 15:162-166.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122 (1):103-111.
- Ducy P, Karsenty G. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 57 (6):2207-2214.
- Dupuytren G. 1831. De la rétraction des doigts par suite d'une affection de l'aponévrose palmaire - description de la maladie - operation chirurgicale qui convient dans ce cas. *J Univ Hebd Med Chir Prat Inst Med*, 5:349-365.
- Elliot D. 1999. The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15:1-19.
- Freehafer AA, Strong JM. 1963. The Treatment of Dupuytren's Contracture by Partial Fasciectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 45:1207-1216.
- Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27 (5):549-550.
- Gobbi G, Sangiorgi L, Lenzi L, Casadei R, Canaider S, Strippoli P, Lucarelli E, Ghedini I, Donati D, Fabbri N, Warzecha J, Yeoung C, Helman LJ, Picci P, Carinci P. 2002. Seven BMPs and all their receptors are simultaneously expressed in osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 20 (1):143-147.
- Grapow M. 1887. Die Anatomie und physiologische Bedeutung der Palmaraponeurose. *Archiv für Anatomie und Physiologie Leipzig, Anatomische Abteilung*, 143:2-3.
- Greenwald J, Groppe J, Gray P, Wiater E, Kwiatkowski W, Vale W, Choe S. 2003. The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell*, 11 (3):605-617.
- Guérin J. 1833. Comments on Dupuytren's disease. *Gazette médicale de Paris*, 2s 1:11-113.

- Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. 1994. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. *Prostate*, 24 (4):204-211.
- Heinzeller T. 2001. Binde- und Stützgewebe. In: Heinzeller T, Büsing, C.M., Hrsg. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. 1.te Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 75-77.
- Henne-Bruns D. 2003. Dupuytren-Kontraktur. In: Kremer B, Hrsg. *Duale Reihe Chirurgie*. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1291-1295.
- Hindman HB, Marty-Roix R, Tang JB, Jupiter JB, Simmons BP, Spector M. 2003. Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br*, 85 (3):448-455.
- Hueston JT. 1969. The control of recurrent Dupuytren's contracture by skin replacement. *Br J Plast Surg*, 22:152-156.
- Hueston JT. 1971. Enzymic fasciotomy. *Hand*, 3 (1):38-40.
- Hurst LC, Badalamente MA. 1999. Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15 (1):97-107, vii.
- Ketchum LD, Donahue TK. 2000. The injection of nodules of Dupuytren's disease with triamcinolone acetonide. *J Hand Surg [Am]*, 25 (6):1157-1162.
- Kiyozuka Y, Nakagawa H, Senzaki H, Uemura Y, Adachi S, Teramoto Y, Matsuyama T, Bessho K, Tsubura A. 2001. Bone morphogenetic protein-2 and type IV collagen expression in psammoma body forming ovarian cancer. *Anticancer Res*, 21 (3B):1723-1730.
- Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Buchler MW, Korc M. 1999. Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo. *Gastroenterology*, 116 (5):1202-1216.
- Kloen P. 1999. New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br J Plast Surg*, 52 (8):629-635.
- Kopp J, Seyhan H, Muller B, Lanczak J, Pausch E, Gressner AM, Dooley S, Horch RE. 2006. N-acetyl-L-cysteine abrogates fibrogenic properties of fibroblasts isolated from Dupuytren's disease by blunting TGF-beta signalling. *J Cell Mol Med*, 10 (1):157-165.
- Ledderhose G. 1897. Zur Pathogenese des Fußes und der Hand. *Langenbecks Arch Klin Chir*, 55:694-712.
- Lin J, Patel, S.R., Cheng, X., Cho, E.A., Levitan, I., Ullenbruch, M., Phan, S.H., Park, J.M., Dressler, G.R. 2005. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med*, 11:387-393.

- Luck JV. 1959. Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *J Bone Joint Surg Am*, 41-A (4):635-664.
- Magro G, Lanteri E, Micali G, Paravizzini G, Travali S, Lanzafame S. 1997. Myofibroblasts of palmar fibromatosis co-express transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor. *J Pathol*, 181 (2):213-217.
- Martini AK. 1985. [Anatomic relations between skin and pathologically changed aponeurosis in Dupuytren disease]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 17 (3):134-138.
- Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Takezawa Y, T CS, Yamanaka H. 2003. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate*, 54 (4):268-274.
- Masur SK, Dewal, H.S., Dinh, T.T., Erenburg, I., Petridou, S. 1996. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Cell Biology*, 93:4219-4223.
- McFarlane RM. 1974. Patterns of the diseased fascia in the fingers in Dupuytren's contracture. Displacement of the neurovascular bundle. *Plast Reconstr Surg*, 54 (1):31-44.
- Millesi H. 1981. Dupuytren-Kontraktur. In: Migst H, Millesi, H., Hrsg. *Handchirurgie*. Aufl. Stuttgart: Thieme,, 15.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (3):251-263.
- Mollenhauer J, Bayreuther K. 1986. Donor-age-related changes in the morphology, growth potential, and collagen biosynthesis in rat fibroblast subpopulations in vitro. *Differentiation*, 32 (2):165-172.
- Murphy MG, Mailhot J, Borke J, Wataha J, Sharawy M, Smith A. 2001. The effects of rhBMP-2 on human osteosarcoma cells and human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Implantol*, 27 (1):16-24.
- Peyronie Fdl. 1819. Sur quelques obstacles qui s'opposent à l'éjaculation naturelle de la semence. *Mem Acad Chir*:425-434.
- Plater F. 1614. *Observationum in hominis affectibus*. 3te Aufl. Basel: König & Brandmyller.
- Pschyrembel. 2002. *Klinisches Wörterbuch*. 259te Aufl. Berlin - New York: Walter de Gruyter.
- Rayan G. 1999. Clinical presentation and types of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15:87-96.

- Rayan GM. 2007. Dupuytren disease: Anatomy, pathology, presentation, and treatment. *J Bone Joint Surg Am*, 89 (1):189-198.
- Rayan GM, Parizi M, Tomasek JJ. 1996. Pharmacologic regulation of Dupuytren's fibroblast contraction in vitro. *J Hand Surg [Am]*, 21 (6):1065-1070.
- Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. 1996. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, (324):39-46.
- Ritter MA. 1973. The anatomy and function of the palmar fascia. *Hand*, 5 (3):263-267.
- Ross DC. 1999. Epidemiology of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15 (1):53-62.
- Rudolph R, Abraham J, Vecchione T, Guber S, Woodward M. 1978. Myofibroblasts and free silicon around breast implants. *Plast Reconstr Surg*, 62 (2):185-196.
- Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G. 1988. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer*, 41 (5):707-712.
- Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 287 (1):103-115.
- Schurch W, Skalli O, Lagace R, Seemayer TA, Gabbiani G. 1990. Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft-tissue tumor differentiation and origin. III. Hemangiopericytomas and glomus tumors. *Am J Pathol*, 136 (4):771-786.
- Seyhan H, Kopp J, Schultze-Mosgau S, Horch RE. 2006. Increased metabolic activity of fibroblasts derived from cords compared with nodule fibroblasts sampling from patients with Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg*, 117 (4):1248-1252.
- Shin SS, Liu C, Chang EY, Carlson CS, Di Cesare PE. 2004. Expression of bone morphogenetic proteins by Dupuytren's fibroblasts. *J Hand Surg [Am]*, 29 (5):809-814.
- Skoog T. 1948. Dupuytren's contracture with special reference to etiology and improved surgical treatment. Its occurrence in epileptics. Note on knuckle pads. *Acta Chir Scand*, 96 ((suppl 139))
- Sugimoto H, Yang C, LeBleu VS, Soubasakos MA, Giraldo M, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *Faseb J*, 21 (1):256-264.
- Tacke F, Gabele E, Bataille F, Schwabe RF, Hellerbrand C, Klebl F, Straub RH, Luedde T, Manns MP, Trautwein C, Brenner DA, Scholmerich J, Schnabl B. 2007. Bone Morphogenetic Protein 7 is Elevated in Patients with Chronic Liver Disease and Exerts Fibrogenic Effects on Human Hepatic Stellate Cells. *Dig Dis Sci*,

- Tomasek JJ, Vaughan MB, Haaksma CJ. 1999. Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 15 (1):21-34.
- Tubiana R. 1986. Evaluation of deformities in Dupuytren's disease. *Ann Chir Main*, 5 (1):5-11.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150 (698):893-899.
- Vande Berg JS, Gelberman RH, Rudolph R, Johnson D, Sicurello P. 1984. Dupuytren's disease: comparative growth dynamics and morphology between cultured myofibroblasts (nodule) and fibroblasts (cord). *J Orthop Res*, 2 (3):247-256.
- Weber L, Mauch C, Kirsch E, Muller PK, Krieg T. 1986. Modulation of collagen type synthesis in organ and cell cultures of fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 87 (2):217-220.
- Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T. 1999. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 36 (2):120-125.
- Wilutzky B, Berndt A, Katenkamp D, Koshmehl H. 1998. Programmed cell death in nodular palmar fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histol Histopathol*, 13 (1):67-72.
- Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. 2005. Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*, 280 (9):8094-8100.
- Zeisberg M, Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., Kalluri, R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, 9:964-968.

Absender:
Prof. Dr. med. Rudolf Venbrocks
OA Dr. med. Andreas Wagner
Lehrstuhl für Orthopädie
Am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH
Klosterlausnitzer Str. 81
07607 Eisenberg

Antrag an die Ethik-Kommission der FSU Jena zur Durchführung von Versuchen an humanem Gewebe und Körperflüssigkeiten

1. Bezeichnung der Studie:

Expression von Wachstumsfaktoren (BMP-2 und BMP-7) bei M. Dupuytren

2. Ziel der Studie:

Nachweis von Wachstumsfaktoren aus klinischen Proben der Palmaraponeurose von Patienten mit Morbus Dupuytren:

Ziel ist die Rolle der Bone Morphogenetic Proteins (BMP) im Krankheitsprozess des M. Dupuytren zu untersuchen und ggf. Rückschlüsse auf ähnlichen Prozesse - wie Wundheilung und Fibrosierung- zu ziehen.

Bei dieser Studie sollen aus Gewebeproben der krankhaft veränderten Palmaraponeurose Wachstumsfaktoren der BMP-Familie nachgewiesen werden.

Dabei soll neben dem prinzipiellen Vorkommen dieser Faktoren und deren Verteilung auch deren Synthese im Gewebe untersucht werden. Die Ergebnisse sollen mit dem Vorkommen und der Expression in gesundem Gewebe der Palmaraponeurose verglichen werden.

In der Zellkultur sollen auf Grundlage des BMP-Musters unterschiedliche Zellklone differenziert werden.

3. Leiter der Studie:

OA Dr. med. Andreas Wagner

Für multizentrische Studie: entfällt

Für lokale Studie:

4. Mitwirkende Ärzte/ Wissenschaftler:

Prof. Dr. med. Rudolf Venbrocks (Lehrstuhl für Orthopädie am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“)

PD Dr. rer. nat. O. Pullig (Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“)

OA Dr. med. Andreas Wagner (Lehrstuhl für Orthopädie am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“)

Henrik Fahner (Student, Humanmedizin, FSU Jena)

5. Wer finanziert die Studie?

Die Untersuchungen werden aus Forschungsmitteln des Lehrstuhl für Orthopädie am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ finanziert.

6. Art, Umfang und Herkunft der Asservate:

Es handelt sich um Gewebeproben aus der Palmaraponeurose von Patienten mit Morbus

Die Indikation des operativen Eingriffs erfolgt unter rein medizinischen Gesichtspunkten, unabhängig von dieser Studie.

Die Aufarbeitung der Proben sollte innerhalb von 2 Monaten erfolgen.

(Literaturkurzfassung in der Anlage)

Ja (☐) **Nein** (☒)
Ergebnis: entfällt

Anschließend soll das nicht-erkrankte Gewebe analysiert und mit dem erkrankten verglichen

werden.

Die Patientenaufklärungsprotokolle werden als Anlage beigelegt.

Eisenberg, 11. Juli 2006

.....
**Unterschrift und Stempel
des Leiters der Studie**

.....
**Unterschrift und Stempel
des Institutsdirektors**

- Literatur:** Luck JV. 1959. Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. J Bone Joint Surg Am, 41-A (4):635-664.
- Shin SS, Liu C, Chang EY, Carlson CS, Di Cesare PE. 2004. Expression of bone morphogenetic proteins by Dupuytren's fibroblasts. J Hand Surg [Am], 29 (5):809-814.
- Terek RM, Jiranek WA, Goldberg MJ, Wolfe HJ, Alman BA. 1995. The expression of platelet-derived growth-factor gene in Dupuytren contracture. J Bone Joint Surg Am, 77 (1):1-9.
- Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. 1995. Transforming growth factor-beta: possible roles in Dupuytren's contracture. J Hand Surg [Am], 20 (1):101-108.



seit 1548

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Medizinische Fakultät

Lehrstuhl für Orthopädie
Waldkrankenhaus
„Rudolf Elle“ gGmbH

Klosterlausnitzer Str. 81
D-07607 Eisenberg

Univ.-Prof.
Dr. med. R.-A. Venbrocks

Telefon: 036691 - 80
Telefax: 036691 - 81013

Patienten-Einverständniserklärung

Der Lehrstuhl für Orthopädie der FSU Jena am Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ bemüht sich um das Verständnis der Ursachen, die zu bestimmten Erkrankungen führen.

Wir möchten Sie deshalb um Ihr Einverständnis bitten, dass ein Teil der bei Ihnen entfernten Gewebe weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen zugeführt werden können.

Mit bestem Dank für Ihr Einverständnis

Klinik für Orthopädie
Waldkrankenhaus „Rudolf Elle“ gGmbH Eisenberg

Hiermit gebe ich meine Erlaubnis, dass die bei meiner Operation entfernten Gewebeteile für wissenschaftliche Untersuchungen weiter verwendet werden dürfen. Mein Einverständnis ist jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufbar.

Bei Ablehnung entsteht mir kein Nachteil für die weitere Behandlung.

Das verwendete Material wird nicht für die Diagnostik benötigt.

Die gewonnenen Daten werden anonymisiert weiterverarbeitet (Datenschutz).

Eisenberg, den.....

(Unterschrift des Patienten)

10.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. A. Wagner,

PD Dr. J. Mollenhauer,

Prof. Dr. R. Kinne,

Dr. R. Vollandt,

PD Dr. A. Berndt,

Dr. K. Katenkamp,

PD Dr. O. Pullig,

J. Neuwirth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Eisenberg, 14. Januar 2008

Henrik Fahner

10.4. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Fahner, Henrik
Geburtsdatum, -ort:	13. Oktober 1982, Apolda

Schul Ausbildung

1989-1993	Grundschule „Am Schötener Grund“, Apolda
1993-2001	Gymnasium „Bergschule“, Apolda
2001	Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

2001-2002	Grundwehrdienst, Fernmelde-Btl. 230, Dillingen/Donau
-----------	---

Hochschulausbildung

2002	Beginn des Medizinstudiums an der Friedrich Schiller Universität, Jena
2004	Physikum
September 2005	Beginn der experimentellen Tätigkeit für die vorliegende Dissertation

Eisenberg, 14. Januar 2008

Henrik Fahner

10.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. R. A. Venbrocks, Direktor des Waldkrankenhauses Rudolf-Elle, Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Meinem Betreuer Herrn Oberarzt Dr. A. Wagner möchte ich für die aufwendige Gewinnung des Probenmaterials, die kritische Würdigung meiner Arbeit und die jederzeitige Ansprechbarkeit, trotz der alltäglichen Praxis als Orthopäde und Unfallchirurg, ganz herzlich danken.

Für die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und die stetige Betreuung danke ich Herrn PD Dr. J. Mollenhauer sehr.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Kinne für den wissenschaftlichen Rat während der Erstellung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn PD Dr. A. Berndt bedanke ich mich für die vielen wertvollen Denkanstöße und die Hinweise zur praktischen Durchführung der Versuche, ebenso bei Frau Dr. Katenkamp für die freundliche Unterstützung bei der pathologischen Stadieneinteilung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. R. Vollandt, der mir in Bezug auf die statistische Auswertung meiner Daten beratend zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich den Mitarbeitern und Doktoranden des Forschungslabors des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg für die freundliche und fachkundige Unterstützung während der praktischen Phase, als auch während der Erstellung des Manuskripts danken: Dr. I. Stonans, PD Dr. O. Pullig, J. Neuwirth, J. Schömburg, C. Müller, C. Mollenhauer, A. Rüttger, S. Neumann, sowie Frau Tröber für ihre Hilfe in der Bibliothek.

Grenzenloser Dank gilt meiner Familie, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Medizinstudium und diese Arbeit erst ermöglichten. Besonders aber meiner Mutter Anke Fahner, die stets selbstlos ein Ohr für jede Art meiner Probleme hatte und mir immer eine Schulter zum Anlehnen war, und meinem Vater Dr. Jürgen Fahner, der in mir schon in sehr jungen Jahren das Interesse an Naturwissenschaften geweckt hat und mich zu dem gemacht hat, was ich heute bin, und meiner Schwester Margit, die immer für mich da ist, wenn ich sie brauche. Liebster Dank gilt auch meiner Lebensgefährtin Diana, die mir mit ihrem Verständnis für die langen Zeiten der Absenz den Rücken frei hielt, um diese Arbeit anfertigen zu können.